

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



*Enzimas microbianas com centros
diférricos na resposta ao stresse oxidativo*

Joana Lúcia Pereira Carrilho

Dissertação

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2014

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



Enzimas microbianas com centros diférricos na resposta ao stresse oxidativo

Joana Lúcia Pereira Carrilho

Dissertação

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

Orientadores:

Professor Miguel Sepúlveda Teixeira, Instituto de Tecnologia Química e
Biológica, UNL

Professora Ana Maria Tenreiro, Faculdade de Ciências, UL

2014



INSTITUTO
DE TECNOLOGIA
QUÍMICA E BIOLÓGICA
ANTÓNIO XAVIER / UNL

Knowledge Creation

Enzimas microbianas com centros diférricos na resposta ao stresse oxidativo

Joana Lúcia Pereira Carrilho

2014

O trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado foi realizado no Instituto de Tecnologia Química e Biológica, na Unidade de Metaloproteínas e Bioenergética sob a orientação direta do Prof. Miguel Sepúlveda Teixeira no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. O desenvolvimento do trabalho teve a colaboração adicional da Dra. Célia Romão no processo de orientação.

“Sede como os pássaros que, ao pousarem um instante sobre ramos muito leves, sentem-nos ceder, mas cantam! Eles sabem que possuem asas.”

Víctor Hugo

Índice

Índice	I
Agradecimentos.....	III
Objetivos.....	IV
Resumo da dissertação.....	V
Abstract	VI
Abreviaturas	VII
Lista de Figuras	VIII
Lista de Tabelas	VIII
1. Introdução	1
1.1 Oxigénio e stresse oxidativo	1
1.1.1 Oxigénio: Redução e espécies reativas (ROS).....	1
1.1.2 Origem e sistemas de destoxificação de ROS.....	2
1.1.3 Ferro em sistemas biológicos.....	5
1.1.4 Stresse oxidativo e nitrosativo e sistema imunitário	6
1.2 Rubreritrinas	7
1.2.1 Família das rubreritrinas.....	7
1.2.2 Domínios estruturais: Rubreritina, Desulfurubreritina e Eritrina	9
1.2.3 Propriedades fisiológicas	10
1.2.4 Mecanismo de redução de H ₂ O ₂	11
1.3 Patógeno <i>Clostridium difficile</i>	11
1.3.1 Microrganismo e mecanismo de infeção.....	11
1.3.2 <i>C.difficile</i> e stresse oxidativo	14
2. Materiais e Métodos	17
2.1 Seleção e clonagem de genes alvo	17
2.2 Transformação celular.....	17
2.3 Purificação de ADN	18
2.4 Testes de expressão das proteínas	18
2.5 Expressão de proteínas	18
2.6 Purificação de proteínas.....	19
2.6.1 Rubreritina.....	19
2.6.2 Rubredoxina	19
2.6.3 <i>High molecular weight</i> rubredoxina	19
2.7 Métodos analíticos.....	19
2.8 Métodos espectroscópicos.....	20
2.9 Ensaio de redução e oxidação	20
2.10 Interação do NO com a rubredoxina	21
3. Resultados	22
3.1 Expressão e purificação de proteínas	26
3.2 Quantificações.....	29

3.3	Espectroscopia UV-Visível	29
3.3.1	Espectros UV-VIS.....	29
3.3.2	Evidência da presença do centro binuclear	31
3.3.3	Redução da rubreritrina com ditionito ou sistema enzimático.....	31
3.3.4	Atividade H ₂ O ₂ -redutase da rubreritrina	33
3.3.5	Interação do NO com a rubredoxina	34
4.	Discussão	38
4.1	Rubreritrimas na destoxificação de ROS	38
4.2	Alinhamento de sequências de aminoácidos de rubreritrimas e rubredoxinas	39
4.3	Caracterização da rubreritrima e rubredoxina de <i>C. difficile</i>	40
4.3.1	Caraterização da rubreritrima.....	40
4.3.2	Caracterização da rubredoxina	41
4.4	Estudo das atividades da rubreritrima de <i>C.difficile</i>	42
5.	Conclusões	44
6.	Referências.....	45
7.	Anexos	50

Agradecimentos

Quero agradecer a todas as pessoas que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho: Ao meu orientador, Prof. Miguel Sepúlveda Teixeira, que permitiu a realização deste trabalho no laboratório e mais que isso possibilitou a minha frequência neste mestrado. Pelas “discussões” científicas, pela paciência e conhecimento que me transmitiu.

À Dra. Célia Romão, pelo acompanhamento em todo o meu percurso pelo ITQB. Pela ajuda incondicional, pelos “puxões de orelhas”, pela determinação e encorajamento. Obrigada pela dedicação em todos os momentos, pelo gabinete de psicologia e pela formação como investigadora e como pessoa.

As duas pessoas supra referidas são, sem dúvida, os responsáveis pelo alcançar desta meta!

À Prof. Ana Tenreiro, pela disponibilidade como orientadora interna e pelas “dicas”.

Aos membros da Unidade de Metaloproteínas e Bioenergética: Ana Paula, Afonso, Bruno, Filipa Calisto, Filipa Sena, Joana, Manuela, Patricia, Paulo, Sandra e Vera.

À Filipa Calisto, a amizade e a disponibilidade dentro e fora do laboratório. Ao Paulo, por todas as palavras animadoras e por me fazer rir todos os dias, e obviamente pela amizade.

Sandra, a amiga que ouve os meus desabafos e dá alento para continuar. A vocês os três, o meu Muito Obrigada.

A Joana, a mais recente aquisição da “macacolândia”, pela amizade e momentos de diversão.

À Ana Paula e ao Bruno, a companhia nas noites de escrita.

Ao meus colegas e amigos do mestrado em Microbiologia Aplicada. Margarida Duarte, pela companhia e apoio.

Inês Basto, Hélder Ribeiro, Bruno Arez e Diogo Dias pela companhia de estudo, partilha de conhecimento e amizade.

Ao Diogo, muito obrigada pela paciência, apoio e carinho incondicional.

A todos os meus amigos do coração pela força e carinho. Aos meus pais, avós e irmãos que sempre me apoiaram e permitiram que chegasse até aqui.

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), projeto PTDC/QUI-BIQ/111030/2009 e PTDC/QUI-BIQ/111080/2009 (MT)

Objetivos

O objetivo central desta tese foi o estudo de enzimas e proteínas associadas à interação entre o sistema imune inato de um patógeno bacteriano, através da destoxificação de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. Escolheu-se um organismo cujo genoma continha genes codificantes para as proteínas referidas: rubreritina e proteínas flavodiférricas, tal como os respetivos parceiros fisiológicos (rubredoxina e NADH: rubredoxina oxidoreductase). Selecionou-se então a estirpe *Clostridium difficile* P28, para futuros estudos *in vitro* das enzimas e respetivos parceiros fisiológicos, de forma a reconstituir as cadeias enzimáticas e compreender a função destas proteínas na resposta a condições de stresse. Estudos anteriores em proteínas desta família foram realizados usando sistemas artificiais de transferência de electrões.

As quatro referidas proteínas foram clonadas em *E.coli*; escolheu-se a rubreritina e os parceiros fisiológicos para iniciar o estudo, de forma a compreender o seu papel na destoxificação de H_2O_2 .

No entanto, devido a problemas experimentais no processo de purificação da *high molecular weight rubredoxina* de *C.difficile* foi necessário utilizar a proteína de *E.coli* para a reconstituição da cadeia enzimática.

Procedeu-se à caracterização bioquímica da rubreritina e rubredoxina isoladas e a sua interação *in vitro*. Em conjunto, estas abordagens permitirão averiguar ao nível molecular o ainda desconhecido mecanismo reacional destas enzimas.

Resumo da dissertação

Este trabalho pretende estabelecer o papel de rubreritinas na resposta microbiana ao stresse oxidativo, nomeadamente na redução do peróxido de hidrogénio. Selecionou-se um patógeno gastrointestinal, contendo a rubreritina e os parceiros fisiológicos, cujos genes foram selecionados para posterior clonagem em *E.coli*.

As rubreritinas são uma vasta família de enzimas, presentes em procariotas aeróbios e anaeróbios (Bactéria e Archaea), bem como em protozoários anaeróbicos. Em conjunto com as redutases do superóxido, constituem uma família de enzimas que destoxificam espécies reativas de oxigénio através da sua redução, acoplada à oxidação de equivalentes redutores do NAD(P)H. Este tipo de reatividade contrasta com as enzimas clássicas, que realizam a destoxificação através da dismutação do ião superóxido ou do peróxido de hidrogénio

Para tal efetuou-se a purificação e caracterização bioquímica e funcional da rubreritina e rubredoxina. Para a reconstituição da cadeia enzimática, utilizou-se uma NADH:rubredoxina oxidoreductase de *E.coli*.

Dos estudos efetuados, observou-se que a rubreritina tem uma massa molecular de 20,4 kDa e uma cor rosa característica. O espectro de Ultra-violeta/visível apresenta picos característicos a 373 nm, 493 nm e 560 nm. Isto sugere a presença dos dois átomos de ferro no centro inserido no domínio de quatro hélices, e do ferro no centro rubredoxina. A proteína é reduzida pelo ditionito de sódio; e após exposição ao ar, reoxida. Demonstrou-se a capacidade desta proteína reduzir o peróxido de hidrogénio, dependente da oxidação do NADH. Determinou-se uma atividade de $34,6 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, bastante superior ao proposto para outras rubreritinas o que pode ser explicado pela ausência de outros sistemas de destoxificação de H_2O_2 no patógeno em estudo.

Palavras-chave: Stresse oxidativo, stresse nitrosativo, rubreritinas, *Clostridium difficile*, peróxido de hidrogénio

Abstract

This study aims to determine the role of microbial rubrerythrins in response to oxidative stress, including the reduction of hydrogen peroxide. It was selected a gastrointestinal pathogen, containing rubrerythrin and its physiological partners, whose genes were used for further cloning in *E.coli*. Rubrerythrins are a large enzyme family present in aerobic and anaerobic prokaryotes (Bacteria and Archaea), as well as in anaerobic protozoa. Together with superoxide reductases, constitute an enzyme family that detoxify reactive oxygen species by its reduction, coupled to oxidation of reducing equivalents in the form of NAD(P)H. This type of reactivity contrast with the classic enzymes that perform detoxification by dismutation of the superoxide ion and hydrogen peroxide. For this we performed the purification and biochemical and functional characterization of rubrerythrin and rubredoxin. For reconstitution of the enzymatic chain, we had to use a NADH:rubredoxin oxidoreductase from *E.coli*. From the performed studies, it was observed that the rubrerythrin has a molecular mass of 20.4 kDa and a characteristic pink color. The visible spectrum shows characteristic bands at 373 nm, 493 nm and 560 nm. This suggests the presence of two iron atoms in the center of the four-helix bundle domain and iron the rubredoxin center. The protein is reduced by sodium dithionite; and reoxidizes after exposure to air. It was demonstrated the ability of this protein to reduce the hydrogen peroxide, linked to NADH oxidation. It was determined by an activity of 34.6 μmol of $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, much higher than that proposed for other rubrerythrins which can be explained by the absence of other detoxification H_2O_2 systems in the pathogen under study.

Keywords: Oxidative stress, nitrosative stress, rubrerythrins, *Clostridium difficile*, hydrogen peroxide

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxiribonucleico
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina do soro bovino
bp	Par de bases
CAT	Catalase
DACD	Doença associada ao <i>C.difficile</i>
Dx	Desulfiredoxina
ϵ	Absortividade molar
<i>g</i>	Força centrífuga relativa
GSH	Glutathiona reduzida
HIF	Fator indutível por hipoxia
HMW_Rd	<i>High</i> molecular weight rubredoxin
ICP-AES	Espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido
iNOS	Sintetase de NO indutível
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
LB	Lysogenic broth
NAD(P)H	(Fosfato) de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NOS	Sintetase do óxido nítrico
OD	Densidade ótica
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PDB	Banco de dados de estrutura de proteínas (Protein Data Bank)
Prx	Peroxiredoxinas
PerR	Regulador do peróxido
Rbr	Rubreritrina
Rd	Rubredoxina
Red	Redutase
RNS	Espécies reativas de azoto
ROS	Espécies reativas de oxigénio
RPE	Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Electrónica
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilenediamina
TPTZ	2,4,6-tripiridil-1,2,3-triazina
Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano
U	Unidades
UV	Ultravioleta
Vis	Visível

Lista de Figuras

Figura 1. Diagrama de orbitais da molécula de oxigénio (4).....	2
Figura 2. Diagrama resumo das principais ROS e sistemas de combate ao stresse oxidativo. ..	4
Figura 3. Alvos e origem de ROS (16).	5
Figura 4. Esquema resumo do desequilíbrio formação/eliminação de espécies reativas de oxigénio (Adaptada de (11)).	6
Figura 5. Stresse oxidativo e nitrosativo.	7
Figura 6. Estrutura tridimensional da rubreritrina de <i>D.vulgaris</i> (código PDB: 1RYT).	8
Figura 7. Dendograma da distribuição das proteínas da família das rubreritrinas (25).	9
Figura 8. Possíveis centros constituintes da rubreritrinas.	10
Figura 9. Microscopia electrónica de <i>C.difficile</i>	12
Figura 10. Representação circular do cromossoma de <i>C.difficile</i>	13
Figura 11. Representação do operão de <i>C.difficile</i> P28 contendo o gene codificante para a rubreritrina em estudo e para o regulador de stresse <i>PerR</i> (70).	16
Figura 12. Alinhamento de sequências de aminoácidos da Rbr de <i>Clostridium difficile</i> (Cd) P28 com rubreritrinas identificadas em outros organismos.....	24
Figura 13. Alinhamento de sequências de aminoácidos da Rd de <i>Clostridium difficile</i> (Cd) P28 com rubredoxinas identificadas em outros organismos.	25
Figura 14. SDS-PAGE 15% das amostras de testes de expressão das proteínas.	26
Figura 15. Processo de purificação da rubreritrina.	28
Figura 16. Processo de purificação da rubredoxina.	28
Figura 17. Espectros UV-Visível das frações finais de proteína em 20 mM Tris-HCl pH 7,5 e 150 mM NaCl.....	30
Figura 18. Espectro UV-Visível da subtração do espectro da rubreritrina pela rubredoxina.	31
Figura 19. Redução gradual de 10µM de CdRbr pela adição gradual de ditionito de sódio.	31
Figura 20. Redução de 1 µM CdRd na presença de 250 nM de EcRed e 200 µM de NADH.	32
Figura 21. Redução gradual de 10 µM de CdRbr na presença 1 µM de CdRd, 250 nM de EcRed e 200 µM de NADH.	32
Figura 22. Redução de 10 µM de CdRbr, usando o sistema de transferência electrónica de 250 nM de EcRed, 200 µM de NADH e 1 µM de CdRd.	33
Figura 23. Atividade H ₂ O ₂ redutase seguindo a oxidação de 200 µM de NADH a 340 nm.....	34
Figura 24. Espectros UV-Visível de 40 µM CdRd em 20 mM Tris-HCl pH 7,5 e 150 mM NaCl.	35
Figura 25. Espectros UV-Visível finais de rubredoxina reduzida com aumento da concentração de Nonoato, 2 horas após o início da reacção.....	36
Figura 26. Espectro de RPE de rubredoxina reduzida estequiometricamente com NADH e na presença de EcRed, após adição de 0,08 mM de Nonoato.	37
Figura 27. Espectros UV-Visível de proteínas da família das rubreritrinas.	39
Figura 28. Espectros UV-Visível de proteínas de centros de ferro.	41

Lista de Tabelas

Tabela 1. Genes codificantes para proteínas envolvidas na destoxificação de ROS, no genoma de <i>C.difficile</i> P28.	15
Tabela 2. Tabela de purificação da rubreritrina (CdRbr) e da rubredoxina (CdRd).	29
Tabela 3. Registo da quantificação de proteína, ferro e zinco pelos diferentes métodos.....	29
Tabela 4. Razões de absorvância dos picos caraterísticos das proteínas.	30
Tabela A 1. Preparação de meio LB e meio LA	50
Tabela A 2. Preparação de tampão de lise	50
Tabela A 3. Preparação de gel SDS 15%	50
Tabela A 4. Composição do meio mínimo.....	50

Parte I

Introdução

1. Introdução

1.1 Oxigénio e stresse oxidativo

1.1.1 Oxigénio: Redução e espécies reativas (ROS)

O oxigénio molecular ou dioxigénio (O_2), foi assim designado por Antoine Lavoisier em 1777 com origem do grego ὀξύς = ácido e, -geno, da raiz γεν = gerar, que significa que “forma ácidos”, e que defendeu que o oxigénio funciona como oxidante no processo de combustão e tem um papel fundamental em processos biológicos (1).

Em 1771, o farmacêutico Carl Scheele percebeu que aquecendo óxido de mercúrio e vários nitratos era produzido um gás, designando-o por “ar de fogo” pois era conhecido como o único que suportava a combustão, porém esta descoberta não teve reconhecimento na altura. Ao mesmo tempo, o britânico Joseph Priestley fazia incidir a luz solar em óxido de mercúrio dentro de um tubo de vidro, libertando-se um gás a que chamou de “ar deflogisticado” e que aumentava a combustão da chama de uma vela. Prosseguindo os seus ensaios, expôs plantas à luz solar e percebeu que também produziam o mesmo gás libertado pelo óxido de mercúrio. Foi assim o primeiro a testemunhar a fotossíntese. Estas descobertas foram publicadas num artigo intitulado “um conto de novas descobertas no ar”, sendo assim atribuída a Priestley a descoberta do oxigénio (2-3).

O oxigénio representa 21% da composição da atmosfera terrestre e é o terceiro elemento químico mais abundante no universo, depois do hidrogénio e hélio. A elevada concentração de oxigénio na Terra resulta do ciclo do oxigénio, que descreve o movimento do gás entre a atmosfera, biosfera e litosfera. O principal fator do movimento do oxigénio é a fotossíntese, que liberta oxigénio na atmosfera enquanto a respiração o consome (4).

Apesar de ser fundamental para a vida aeróbia, o oxigénio pode tornar-se tóxico em concentrações elevadas provocando graves danos celulares. O O_2 tem um elevado poder de oxidação, o que se traduz na suscetibilidade a receber electrões nas reações de oxidação-redução (1). A sua redução completa a água tem um potencial de redução de 0.815V a pH 7 e 25°C. No estado fundamental é um tripleto, cujas orbitais têm dois electrões desemparelhados com o mesmo *spin* (Figura 1), o que limita a sua reatividade (5).

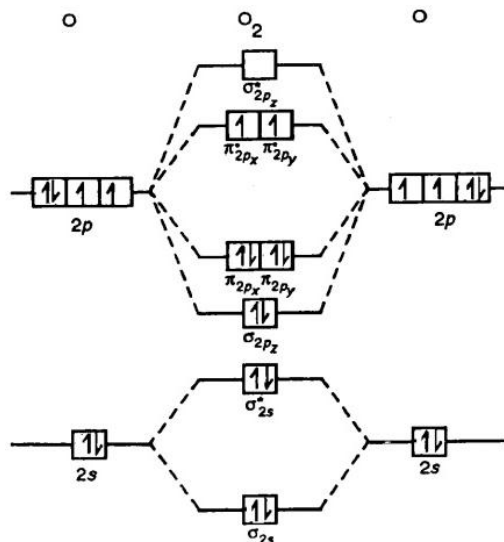


Figura 1. Diagrama de orbitais da molécula de oxigénio (4).

Devido à regra da conservação do *spin*, a reação do oxigénio acontece de forma que o spin total num dado processo reacional não seja alterado. Esta regra é contrariada se a oxidação pelo oxigénio acontecer por inversão do spin, ou pode ser contornada se o redutor for uma espécie paramagnética (por exemplo, um radical ou um metal de transição) (6). Estas reações de transferência de electrões geram espécies reativas de oxigénio (ROS) tais como o anião superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e radicais hidroxilo (OH^{\cdot}).

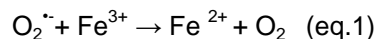
1.1.2 Origem e sistemas de destoxificação de ROS

Todos os sistemas biológicos estão sujeitos à ação de espécies reativas de oxigénio uma vez que são produzidas durante o metabolismo aeróbio ou após exposição transiente a oxigénio de anaeróbios. A origem de ROS deve-se ainda à radiação ionizante ou a reações envolvendo metais de transição (7).

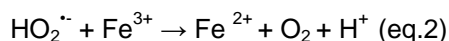
O superóxido ($O_2^{\cdot -}$) é o radical mais comum em organismos vivos e pode atuar como redutor ou oxidante provocando a formação de outras ROS. Entre 2% a 5% do oxigénio presente em células animais é convertido em radical superóxido (8-9). As vias de produção deste radical são várias, entre elas pela cadeia respiratória mitocondrial ou via xantina oxidase.

O $O_2^{\cdot -}$ é formado pela adição de um electrão ao oxigénio. Este radical em ambientes acídicos, converte-se na sua forma não carregada, o radical hidroperoxilo (HO_2^{\cdot}) (10) (11).

Estes dois radicais são capazes de converter o ião férrico a ferroso pela reação:



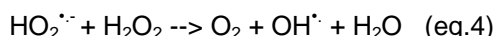
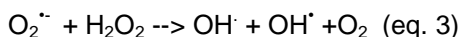
ou



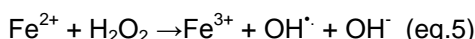
O peróxido de hidrogénio (H_2O_2) é uma molécula potencialmente tóxica devido à sua capacidade de penetrar membranas biológicas e ser altamente estável. É um não radical formado de diversas formas:

1. Pela dimerização dos radicais hidroxilo: $2\text{HO}^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$
2. Autodismutação do anião superóxido: $\text{O}_2^{\bullet-} + \text{O}_2^{\bullet-} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
3. Pela redução consecutiva de O_2 por 2 electrões: $\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$

O H_2O_2 é solúvel em solução aquosa e participa em várias reações, aumentando a produção de espécies reativas de oxigénio, como o radical hidroxilo pela reação de Haber-Weiss (11) (eq.3 e eq.4):



Na presença de iões de ferro no estado oxidado, o H_2O_2 é reduzido segundo a reação de Fenton (eq.5), produzindo o radical hidroxilo:



O ferro é o metal principal neste tipo de reação, mas outros metais de transição como o cobre podem participar (12-13). O peróxido de hidrogénio é formado subsequentemente pelas vias de produção de superóxido; é reduzido a água por sistemas enzimáticos, como catalases, peroxidases, redutases de glutatona ou rubreritinas (13) (Figura 2A).

O radical hidroxilo é formado pela reação entre $\text{O}_2^{\bullet-}/\text{HO}_2^{\bullet}$ e H_2O_2 , as referidas reações Haber-Weiss (11). É a ROS com maior reatividade ($>10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e não existe nenhum sistema de destoxificação para esta espécie.

As ROS são capaz de causar danos em alvos biológicos tais como ADN, lípidos e proteínas (Figura 3). Este efeito resulta do desequilíbrio entre os sistemas de produção e de eliminação de ROS, designando-se de stresse oxidativo. No entanto, em concentrações fisiológicas algumas ROS atuam como mensageiros celulares de sinalização redox.

Assim, os organismos vivos desenvolveram sistemas de defesa de ROS quando estas se tornam tóxicas. Existem três formas de defesa a ROS:

1. Prevenção na formação de ROS
2. Eliminação de ROS
3. Reparação de danos celulares provocados por ROS

O ponto 1 baseia-se em diferentes mecanismos, entre eles o transporte de oxigénio na forma não livre, a quelatação de metais durante o transporte e armazenamento impedindo a ocorrência da reação de Fenton, a organização do ADN em cromatina, e a redução do oxigénio a água (14).

Os sistemas enzimáticos de destoxificação de espécies reativas de oxigénio designam-se por antioxidantes e destacam-se a superóxido dismutase (SOD), peroxidases, catalases (CAT) e outras pequenas moléculas como a glutatona, vitamina C e vitamina E. Por outro lado existem outros sistemas redutores de combate ao stresse oxidativo, baseados em algumas das enzimas alvo deste estudo, como as proteínas flavodiféricas ou rubreritinas, ou ainda oxidases membranares do tipo citocromo bd e superóxido redutases (Figura 2 B).

As SOD desempenham a sua função central na defesa de ROS em todos os organismos aeróbios. Encontra-se na maioria dos compartimentos celulares e participam na regulação da presença de H_2O_2 nesses compartimentos.

Estas enzimas são classificadas de acordo com o cofator metálico sendo cobre/zinco (Cu/Zn-SOD) e encontradas no citosol de eucariotas, no periplasma de bactérias ou nos cloroplastos de mamíferos; ferro (FeSOD), manganês (MnSOD) ou níquel (NiSOD) encontradas no citoplasma de organismos procariotas (15).

As peroxidases são uma família de enzimas que atuam na redução de H_2O_2 , da qual faz parte a catalase, glutathione redutase e peroxiredoxina (Prx). Podem classificar-se de acordo com a presença ou ausência de um grupo heme, como hémicas ou não-hémicas. As hémicas catalisam a peroxidação de substratos usando o íon de ferro presente no grupo heme, e são o tipo de enzimas encontradas em bactérias.

A catalase é a principal enzima na destoxificação de H_2O_2 . Converte duas moléculas de H_2O_2 a água e oxigênio (eq.6) (Figura 2A).

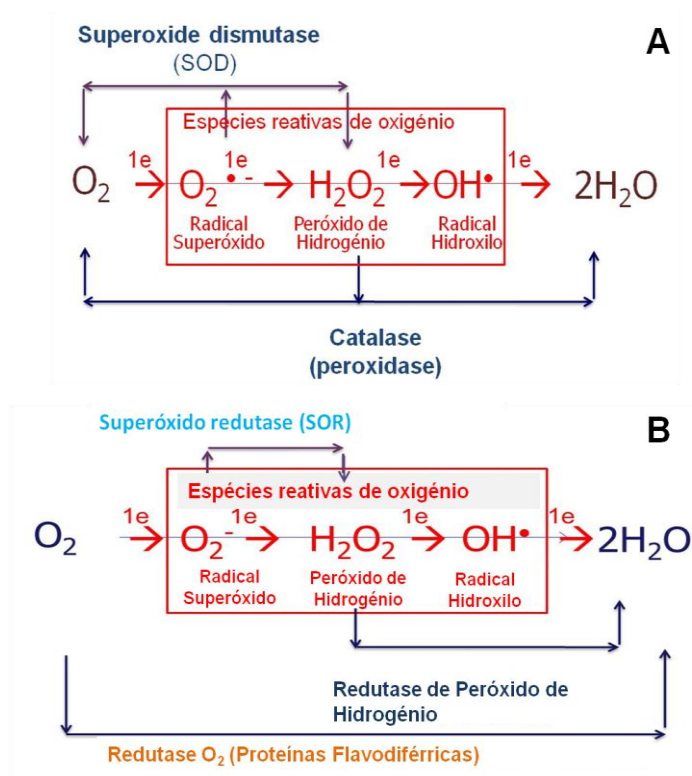
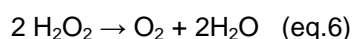


Figura 2. Diagrama resumo das principais ROS e sistemas de combate ao stresse oxidativo. Destoxificação por mecanismos de dismutação (A) ou de redução (B).

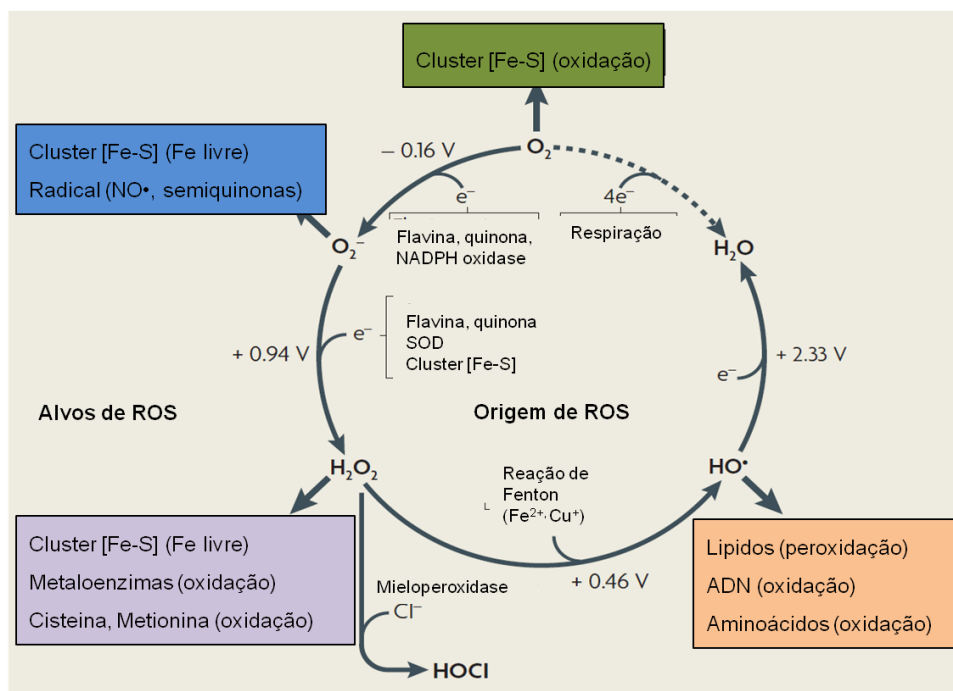


Figura 3. Alvos e origem de ROS (16).

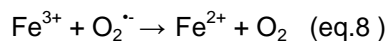
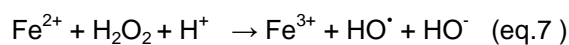
O ponto 3 na defesa a ROS, consiste em sistemas celulares de reparação do ADN afetado pela ação de ROS, baseando-se essencialmente na ação de fosfolipases e proteases.

1.1.3 Ferro em sistemas biológicos

O ferro é o cofator preferencial em reações de transferência electrónica. Pode apresentar-se em diferentes estados de oxidação, entre -2 e +6 mas em sistemas biológicos existe somente na forma Fe^{2+} , Fe^{3+} ou Fe^{4+} (8, 14, 17).

O ferro livre na célula consegue reagir com o oxigénio, e segundo a reação de Fenton o ião no estado ferroso reduz o H_2O_2 produzindo OH^\bullet e Fe^{3+} (eq.7).

A reação completa-se pela transferência de um electrão do Fe^{3+} ao superóxido (eq.8).



Para controlar os níveis de ferro disponíveis na célula existem sistemas reguladores compostos por proteínas que eliminam o ferro livre (8), e controlando a sua captação através de sensores e sistemas de regulação.

A família de proteínas reguladoras da assimilação de ferro (Fur), funcionam com repressores transcricionais, pois reprimem a transcrição de genes responsáveis pela aquisição de ferro, mediante a interação com o Fe^{2+} . Este mecanismo funciona como defesa contra a colonização microbiana, uma vez que os patogéneos necessitam de ferro para a sua sobrevivência (18).

1.1.4 Stresse oxidativo e nitrosativo e sistema imunitário

O termo stresse oxidativo refere-se ao desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigénio e sistemas de destoxificação ou de reparação dos danos causados por essas espécies (Figura 4). O stresse oxidativo está relacionado com a ocorrência de patologias no homem, como o Parkinson, cancro, Alzheimer, arteriosclerose, entre outras (19-20).

As ROS mais estudadas são o superóxido e o peróxido de hidrogénio, produtos do metabolismo aeróbio com capacidade serem produzidos por macrófagos, o que os torna particularmente importantes no combate contra espécies invasoras.

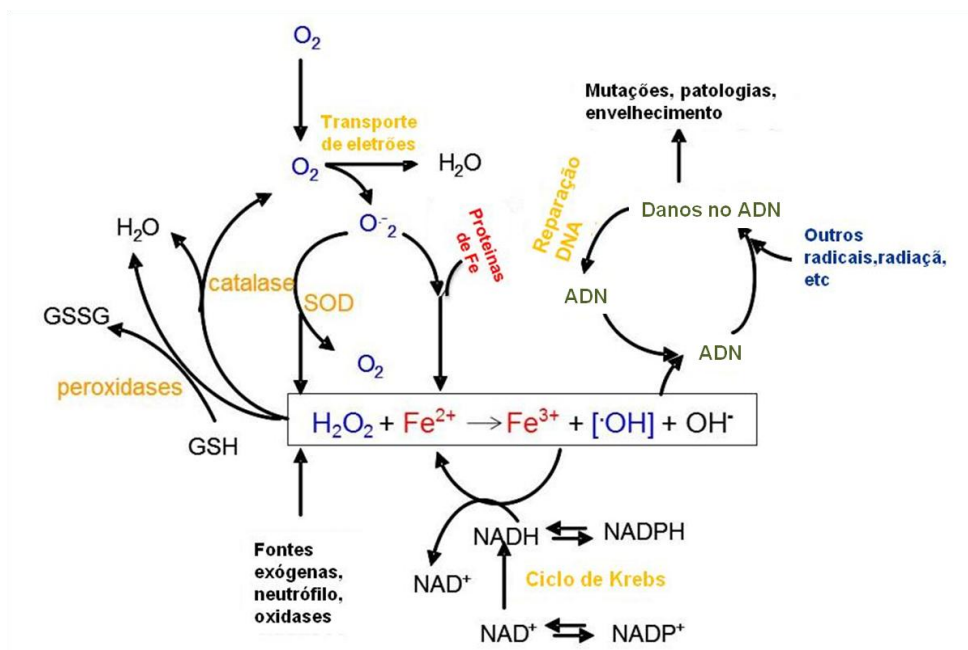


Figura 4. Esquema resumo do desequilíbrio formação/eliminação de espécies reativas de oxigénio (Adaptada de (11)).

Um processo intimamente ligado ao stresse oxidativo é a reatividade de espécies derivadas de NO (Figura 5 A). O stresse nitrosativo representa o desequilíbrio entre sistemas de produção e eliminação de espécies reativas de azoto (RNS).

O óxido nítrico (NO) é o principal radical livre envolvido no stresse nitrosativo. O NO é uma molécula não-polar e não-carregada, com um electrão desemparelhado; consegue reagir rapidamente com radicais como o O_2 , $O_2^{\cdot-}$ ou iões metálicos, numa reação mais lenta (21-22). É gerado biologicamente pela arginina, O_2 e NADPH pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). No contexto da interação patógeno/hospedeiro é particularmente importante a indução da NOS em macrófagos após interação com patógenos (Figura 5 B).

O NO pode também ser formado pela ação da nitrito redutase, em que esta enzima catalisa uma reação em que o NO é um intermediário no processo de desnitrificação (23). A produção não enzimática deriva de uma leve acidificação de NO_2^- , e ocorre durante a hipoxia ou acidogénese.

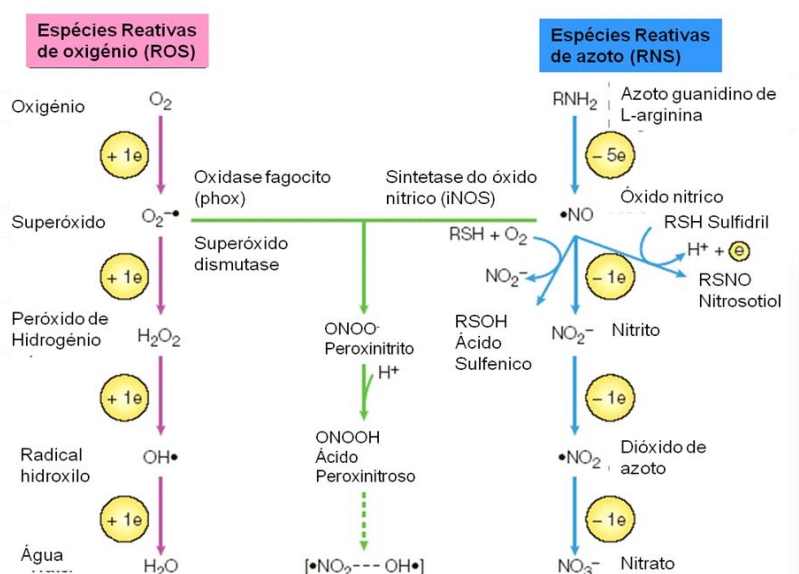
O NO pode ter efeitos benéficos em sistemas biológicos quando se encontra em baixas concentrações (na ordem de nanomolar) tendo um importante papel em processos de sinalização, vasodilatação, neurotransmissão, processos inflamatórios, proliferação celular e

apoptose. Em concentrações da ordem dos micromolar, consegue reagir com O_2 ou $O_2^{\cdot-}$, produzindo espécies reativas de azoto (RNS) com efeitos severos nos organismos vivos, como oxidação, nitroação, nitrosilação ou nitração. O NO é também um produto do sistema imunitário dos mamíferos; tem uma ação antimicrobiana pois consegue reduzir a replicação de patógenos (bactérias, vírus ou protozoários) (24).

A reação do NO com o O_2 , em estado gasoso, origina o radical peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$). Este radical pode reagir novamente com NO originando o dióxido de azoto ($\bullet NO_2$); o $\bullet NO_2$, em solução aquosa, pode dimerizar formando o tetraóxido de dinitrogénio (N_2O_4), que se dissolve em água originando nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-).

As RNS podem ser produzidas pelas bactérias desnitrificantes e por macrófagos e neutrófilos. Todas as bactérias até agora estudadas tem além de sistemas de destoxificação de ROS também sistemas de destoxificação de NO, como as proteínas flavodiférricas, globinas ou as nitrito redutase multihémicas.

A



B

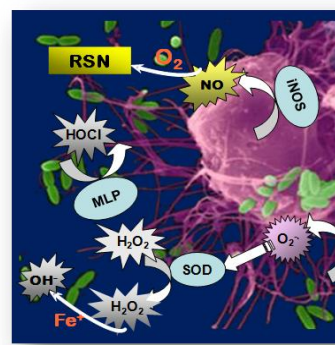


Figura 5. Stresse oxidativo e nitrosativo.

A- Espécies reativas de oxigénio e de azoto, a sua formação e enzimas envolvidas; **B-** ROS e RNS envolvidas na ativação de macrófagos (Adaptada de (12))

1.2 Rubreritinas

1.2.1 Família das rubreritinas

As rubreritinas (Rbr) são uma família de proteínas de ferro, não-hémicas, constituídas por dois tipos de centros de ferro: um centro diférrico localizado no domínio estrutural de quatro hélices e um centro rubredoxina (Rd) [$FeCys4$] localizado na extremidade C-terminal na maioria das rubreritinas.

A origem do nome destas proteínas provem da presença dos centros rubredoxina e hemeritrina. A hemeritrina é uma proteína transportadora de oxigénio cujo nome deriva da cor

característica (eritrina que significa vermelho em grego, e heme pela semelhança funcional com a hemoglobina) e que contém um centro diférrico (25) .

A primeira rubreritrina foi isolada da bactéria anaeróbia *Desulfovibrio vulgaris* (Figura 6A) (26), e de seguida em outros procariotas como *Clostridium* (27) e *Porphyromonas*; foram já isoladas de arqueas e.g., *Sulfolobus tokodaii* e de organismos eucariontes como *Trichomonas vaginalis* (Figura 7) (28).

O centro diférrico é o centro catalítico e os ligandos dos ferros são duas histidinas, quatro carboxilatos e um glutamato, dependente do estado de oxidação. Na forma oxidada, o Fe1 é coordenado por quatro resíduos glutamato e o Fe2 por três glutamatos e uma histidina. Os dois ferros estão ligados por uma molécula de solvente e dois dos glutamatos (Figura 6B).

No estado reduzido da proteína, cada ferro está coordenado com um resíduo histidina, três glutamatos e uma molécula de água (Figura 6C).

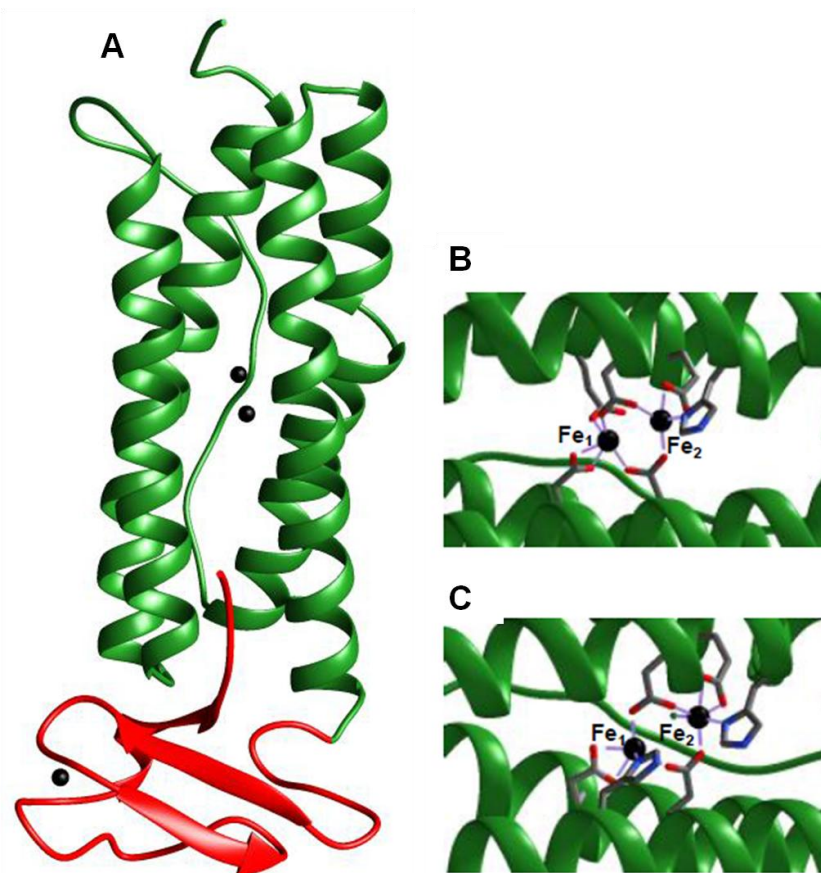


Figura 6. Estrutura tridimensional da rubreritrina de *D. vulgaris* (código PDB: 1RYT).

O verde corresponde ao domínio de quatro hélices e o vermelho ao domínio rubredoxina. As esferas pretas representam os átomos de ferro. A- Rubreritrina na conformação monomérica; B- Centro diférrico no estado oxidado; C- Centro diférrico no estado reduzido (33).

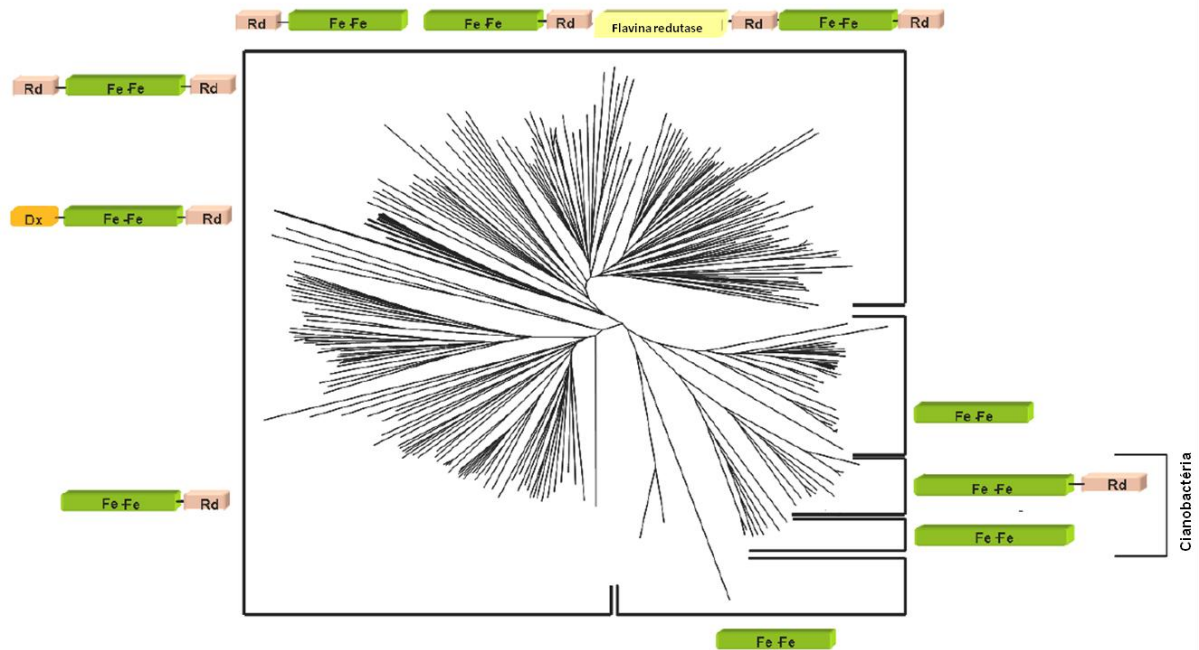


Figura 7. Dendrograma da distribuição das proteínas da família das rubreritrinas (25).

1.2.2 Domínios estruturais: Rubreritrina, Desulfurubreritrina e Eritrina

A vasta diversidade de proteínas desta família deve-se às diversas combinações dos domínios estruturais.

Os arranjos possíveis são a presença do centro rubredoxina na extremidade C-terminal e/ou N-terminal; a presença de outros domínios no N-terminal como a desulforedoxina designando a desulfurubreritrina (DRbr); os tamanhos dos centros rubredoxina e diférrico, ou proteínas constituídas apenas pelo domínio de quatro hélices contendo um centro de dois ferros (Figura 8). Este último, é o exemplo mais simples e designa-se por eritrina (Er); sulreritrina a proteína isolada do aeróbio *Sulfolobus tokodaii* ou simeritrina se encontrada em *Cyanophora paradoxa* (29).

Na extremidade C-terminal das rubreritrinas existe um átomo de ferro coordenado pelo enxofre de quatro cisteínas, designado de centro rubredoxina (30).

As rubredoxinas são pequenas proteínas, em que o centro metálico tem uma geometria tetraédrica, classificadas em tipo I ou tipo II, de acordo com a distância em aminoácidos da ligação do átomo de ferro aos resíduos de cisteínas (31).

De acordo com o número de aminoácidos entre os pares de cisteínas ligandos do ferro a rubredoxina tipo I é $C_{xx}C...C_{xx}C$ e o tipo II é $C_{xxxx}C...C_{xx}C$. A desulforedoxina (Dx) é uma proteína tipo rubredoxina [FeCys4] em que não existem resíduos entre as cisteínas do segundo par ou seja $C_{xx}C...CC$. Esta diferença provoca uma distorção na estrutura da proteína (25).

Todos os centros tipo rubredoxina encontrados nas rubreritrinas são do tipo I ou Dx.

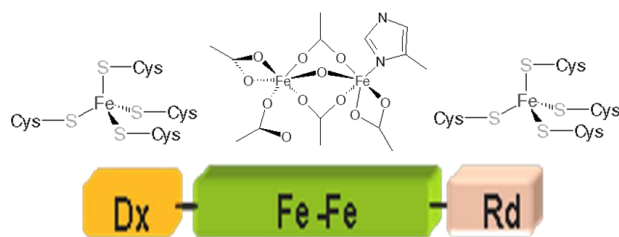


Figura 8. Possíveis centros constituintes da rubreritinas.

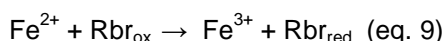
Esquerda: centro desulforedoxina, Caixa amarela; centro: domínio binuclear de ferro, caixa verde: domínio binuclear de ferro; direita: domínio rubredoxina, caixa rosa.

1.2.3 Propriedades fisiológicas

A função destas proteínas ainda não está compreendida, e várias tem sido as atividades atribuídas tais como ferroxidase, superóxido dismutase, pirofosfatase ou redutase de H_2O_2 dependente da oxidação de NADH (27-28, 30).

Pensa-se que estas proteínas são citoplasmáticas visto que não possuem péptidos de sinalização para o periplasma. Rubreritinas foram encontradas em estirpes cujo genoma não contém genes codificantes para catalases, e já se observou que estirpes em que gene codificantes para a rubreritina foi eliminado, são mais sensíveis ao oxigênio e ao peróxido de hidrogênio (25). Isto reforça a ideia defendida por vários autores, de que estas proteínas têm atividade *in vivo* de redução de H_2O_2 , sendo de extrema importância em organismos anaeróbios.

A estrutura tridimensional do centro binuclear de dois ferros desta proteína é muito semelhante com a estrutura das ferritinas, proteínas responsáveis pelo armazenamento de ferro, no entanto as rubreritinas oxidam o ião ferroso (eq.9 e eq.10) mas não é função destas proteínas o armazenamento de ferro (32).



Em 2001, Lumpio e colaboradores usaram uma estirpe de *E.coli* (QC774) deficiente na enzima superóxido dismutase, transformada com o plasmídeo codificante para a rubreritina; não observaram diferenças significativas entre a estirpe transformada e a estirpe não transformada. A hipótese da rubreritina atuar como superóxido dismutase foi assim descartada (33). Por outro lado uma estirpe de *E.coli* (NC202) deficiente em genes codificantes para a catalase, foi também transformada com o plasmídeo contendo o gene codificante para a rubreritina; observou-se que após 30 minutos de exposição a 2,5 mM de H_2O_2 aumentou a expressão de rubreritina e nigeritina (Ngr) de *D.vulgaris*, conferindo elevada taxa de sobrevivência quando comparada à estirpe tipo (33). Ainda, uma cultura de células de *D.vulgaris* foi exposta ao oxigênio durante uma hora; foi analisado o conteúdo de ARN que revelou que os níveis expressão de rubreritina e a transcrição de genes codificantes para essa proteína, diminuiram (34). Células de *Campylobacter* (*C.*) *jejuni* foram expostas a H_2O_2 , e os níveis de rubreritina decresceram (35).

Uma estirpe do patógeno procariota, *Porphyromonas (P.) gingivalis* foi mutada no gene codificante para a rubreritrina. M.Sztukowska demonstrou que a estirpe mutada é mais sensível na exposição ao oxigénio e ao peróxido de hidrogénio. Na estirpe tipo, exposta às mesmas condições o aumento da transcrição do gene para a rubreritrina foi notável (32).

O estudo deste modelo teve particular interesse pois demonstrou que a rubreritrina desempenha um papel essencial na sobrevivência do patógeno na presença de uma resposta imune ativa do hospedeiro.

No estudo referido, pela primeira e única vez, foi proposto que a rubreritrina não está associada com a rutura respiratória dos neutrófilos mas com a produção de espécies reativas de azoto (RNS) pela indução da síntese de óxido nítrico (iNOS) nos macrófagos (36). O aumento da expressão da rubreritrina foi observada numa estirpe de *C.acetobutylicum*, mutada no gene *perR*, codificante para a peroxidase (37). A atividade fisiológica destas proteínas é ainda uma incógnita que será certamente estudada por um longo período de tempo.

1.2.4 Mecanismo de redução de H₂O₂

A atividade mais aceite para a rubreritinas é a redução do peróxido de hidrogénio dependente de uma cadeia de transferência de electrões provenientes do NAD(P)H (33, 38-39). No entanto, estudos realizados relatam baixa atividade peroxidase (cerca de $2 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$) comparada com as peroxidases canónicas ($1,7 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$). Estes resultados podem ser influenciados por não serem usados os doadores de electrões fisiológicos (40). A redução do H₂O₂ ocorre no centro binuclear, sendo a transferência de electrões realizada pelo domínio rubredoxina.

Assim, alguns autores defendem que rubredoxinas são doadores fisiológicos de electrões para as rubreritinas; em diversas estirpes os genes codificantes para rubreritinas e outras proteínas envolvidas na resposta ao stresse oxidativo, encontram-se no mesmo *cluster* (41). Em *Clostridium thermoaceticum* um *cluster* de 5 genes codifica para a superóxido redutase (SOR), a proteína flavodiférrica (FDP), a rubredoxina (Rd) e uma rubredoxina de elevada massa molecular (HMW) (42).

Existem rubreritinas em organismos que não possuem rubredoxinas, o que sugere que o dador de electrões poderá ser uma NAD(P)H oxidoreductase.

1.3 Patógeno *Clostridium difficile*

1.3.1 Microrganismo e mecanismo de infeção

Clostridium (C.) é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia estrita, pertencente aos Firmicutes, com capacidade de produzir endósporos. Durante a fase de esporulação, tem capacidade de produzir uma grande variedade de metabolitos primários, como o butanol e outros complexos orgânicos (43). As células de *Clostridium* têm forma de bastonete, de onde provém o nome; *Kloster* significa bastonete em grego. Existem mais de 150 espécies de *Clostridium*, das quais 15 são altamente patogénicas, como *C.difficile*, *C.botulinum*, *C.tetani* e *C.perfringens*.

Produzem várias toxinas, no entanto a origem destas continua a ser um enigma. As toxinas são os principais fatores de virulência destes microorganismos, causando graves patologias no homem e animais. Estas toxinas foram identificadas com letras (A-G).

Com base no alinhamento do ADN, as espécies de *Clostridium* formam 16 diferentes grupos. A maioria das espécies é incluída no grupo 1, representativo da espécie e considerado como “o verdadeiro” (45-46).

Clostridium difficile (Figura 9), isolado pela primeira vez em 1935 é um comensal do trato gastrointestinal, patogéneo, produtor de esporos e abundante no solo e águas estagnadas. É conhecido por causar diarreia associada a antibióticos (DACD) (47), que podem variar de uma diarreia até uma colite pseudomembranosa (48).

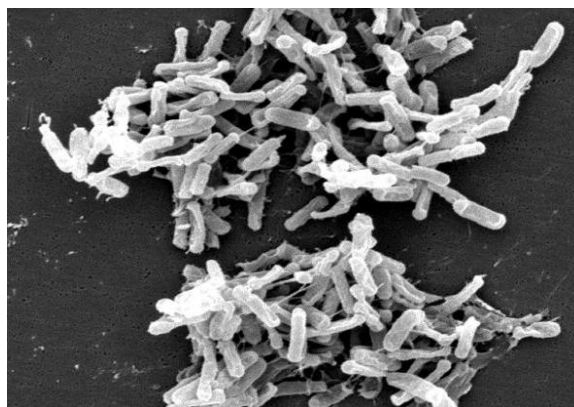


Figura 9.Microscopia electrónica de *C. difficile*
(Adquirida de CDC/ Lois S. Wiggs)

Os esporos são muito resistentes, podendo permanecer em hospitais durante longos períodos de tempo e daí resultar uma importante fonte de surtos hospitalares da doença por *C. difficile*. Entre os fatores de risco para a ocorrência de doença associada a *C. difficile* (DACD), destaca-se o uso de antibióticos, nomeadamente clindamicina, ampicilina e cefalosporinas de terceira geração (46, 49). Esta espécie tem diversos fatores de virulência; o fator de adesão, que medeia a ligação às células humanas; a formação de esporos, que é uma forma de sobrevivência do microorganismo; a atividade hidrolítica (hialuronidase) e as toxinas A (enterotoxina) e B (citotoxina) (50).

Desde o final dos anos 90 que foram detetadas alterações epidemiológicas. Notou-se um aumento de casos de DACD, nomeadamente nos Estados Unidos, Canadá e alguns países europeus. Este aumento foi atribuído ao aparecimento de uma nova estirpe de *C. difficile* B1/NAP1/027, pertencente ao ribotipo 027.

C. difficile produz além das toxinas A e B, uma toxina binária, uma transferase formada por 2 subunidades (cdtA e cdtB), codificadas no locus de patogenicidade (PaLoc) (51). O mecanismo de produção da toxina tem sido o principal foco de estudo de forma a compreender o mecanismo de virulência de *C. difficile*.

No entanto, usando um rato como modelo animal, observou-se que a toxina B desempenha um papel significativo na infeção (52). Um estudo recente demonstrou que o domínio de

ligação da toxina B em estirpes 027 é altamente divergente quando comparada com outras estirpes de *C. difficile* (53). O PaLoc contém componentes reguladores da toxina, incluindo *tcdR*, factor sigma, e *tcdC*, um regulador negativo que destabiliza a haloenzima TcdR impedindo a transcrição do PaLoc (54).

O mecanismo de virulência deste microrganismo ainda esta por compreender, pois além dos determinantes de virulência clássicos muitos outros fatores devem ser tidos em consideração, como a resistência aos antibióticos, a mobilidade e a aderência ao intestino, a resistência aos sais biliares (55), entre outros.

Em 2006, o Instituto Sanger completou a sequenciação do genoma da estirpe *C. difficile* 630. O genoma consiste num cromossoma circular de 4,929,252 bp com 29,06% de conteúdo GC e um plasmídeo circular com 7,881 bp com 27,9% de GC (Figura 10). Outras estirpes já foram sequenciadas, *C. difficile* R20291, *C. difficile* 196, *C. difficile* B11, *C. difficile* M120 e *C. difficile* M68.

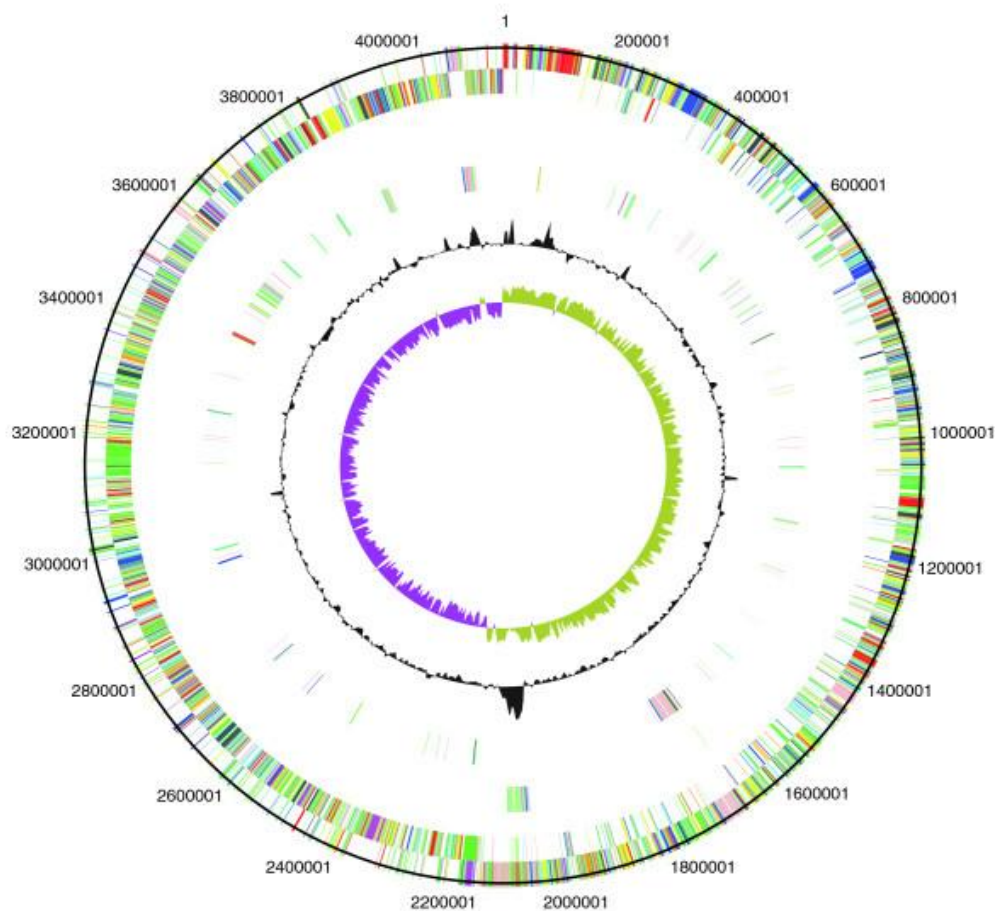


Figura 10. Representação circular do cromossoma de *C. difficile*.

A partir do lado de fora (escala em pb): Círculos 1 e 2 mostram a posição do CDS R20291 transcritas no sentido horário e anti-horário colorido de acordo com a função; círculo 3 representa CDS R20291; círculo 4 representa CDS R20291 e CD196; círculo 5 refere-se ao conteúdo GC; círculo 6 mostra desvio GC (> 0%, verde; < 0%, roxo). Código de cores para funções: azul-escuro, patogenicidade e/ou adaptação; preto, metabolismo de energia; vermelho, transferência de informação; verde-escuro, associado à superfície; ciano, degradação de moléculas complexas; magenta, a degradação de moléculas simples; amarelo, metabolismo central; verde-claro, desconhecido; azul claro, reguladores; laranja, funções conservadas; castanho, pseudogenes; rosa, fagos e elementos de inserção de sequência; cinza, variado (43).

1.3.2 *C.difficile* e stresse oxidativo

Após a colonização do intestino do hospedeiro, o microrganismo inicia a produção de toxinas (A,B, cdtA e cdtB), que são os efetores primários da infecção pelo patógeno. Estas toxinas desencadeiam uma resposta inflamatória severa, com o aumento da citosina pró-inflamatória, interleucina-8, interleucina-1 β e fator- α de necrose tumoral (56). De seguida, as toxinas são difundidas para as células epiteliais por endocitose; as toxinas glicosilam e as proteínas Rho são inativadas para atuar sobre o citoesqueleto da actina que assim compromete a barreira epitelial, destabilizando o contato entre junções (57).

As células epiteliais do intestino conseguem ativar uma diversidade de genes codificantes para proteínas de reparação da barreira epitelial: a maior parte destas vias de reparação são controladas por um fator indutível por hipóxia (HIF-1) mediado por respostas transcricionais (58).

O HIF-1 é um heterodímero formado por subunidades α e β e já foi demonstrada a sua função de proteção em patologias inflamatórias intestinais, no entanto a sua atividade é influenciada por outros genes incluindo o fator de crescimento vascular endotelial (59), pela óxido nítrico sintetase (60) entre outros. A atividade de HIF-1 é mediada pela biodisponibilidade de HIF-1 α . O oxigénio tem uma forte influência na atividade de HIF-1 α pois esta subunidade é degradada pela presença de O₂ (61-62) mas outros fatores foram descritos como tendo um papel essencial, como o óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigénio (ROS) e mediadores inflamatórios (63-64). No sentido de compreender estas interações, foram realizados estudos para compreender o papel do NO e ROS no ambiente gastrointestinal, que indicou a importância destas moléculas para a homeostasia gastrointestinal. Este equilíbrio pode ser alterado com a ocorrência de uma infecção ou o desencadeamento de uma resposta inflamatória.

A estirpe 630 de *C.difficile* tem sido das mais estudadas, mas apenas no ano de 2013 foi publicado um estudo *in vivo* usando o rato como modelo animal, de forma a compreender o perfil de expressão génica deste microorganismo durante o processo de infecção gastrointestinal. Até essa altura, os estudos relatados foram realizados *in vitro* (65).

Observou-se que 549 genes são regulados durante o crescimento *in vivo* e distribuídos por diversas categorias funcionais. Entre estes foram analisados os genes na resposta ao stresse oxidativo (66).

Este procariota possui sistemas de aquisição de ferro, na sua forma férrica ou ferrosa, tais como sistemas de transporte tipo ABC e sistemas tipo 3Feo. O sistema Feo é formado por duas proteínas: uma proteína transmembranar FeoB e uma pequena proteína FeoA; FeoB atua como permease para permitir o transporte de ferro até à célula e tem atividade GTPásica. No entanto durante a infecção, apenas FeoA é sobrerregulada. Recentes estudos em *Salmonella enterica* revelaram que FeoA é um ativador da atividade GTPásica de FeoB. Este mecanismo pode ser uma forma de poupança de energia pelo microorganismo. Durante a infecção a expressão de proteínas dependentes de ferro aumenta, tais como EutG (CD1907), uma putativa ferredoxina oxidoreductase (CD0115) e a rubreritina (CD2848) (67).

O peróxido de hidrogénio é gerado no meio intracelular pela exposição da bactéria ao oxigénio ou extracelular pelo processo inflamatório no intestino. Assim, o genoma de *C.difficile* contém várias proteínas envolvidas na resposta ao stresse oxidativo, uma superóxido dismutase de manganês, catalases de manganês, tiol peroxidase e quatro rubreritinas. Observou-se que os níveis de transcrição de superóxido dismutase aumentaram com a adição crescente de H_2O_2 e que a rubreritina é altamente expressa nas 14 e 38 horas após a infeção. Isto sugere que esta proteína tem um importante papel na destoxificação de H_2O_2 , e na proteção do stresse oxidativo (66). A mesma observação foi feita em *C.acetobutylicum*, os genes codificantes para rubreritinas são altamente expressos após à exposição ao oxigénio ou peróxido de hidrogénio. Na gram negativa *Porphyromonas gingivalis* observou-se que as rubreritinas conseguem eliminar o H_2O_2 e possivelmente estão envolvidas na proteção contra espécies reativas de azoto (RNS) (68).

Para a estirpe de estudo neste trabalho, a sequenciação do genoma foi concluída no ano de 2013 e tem um tamanho de 4,328,909 bp. São descritas algumas das proteínas possivelmente envolvidas na resposta ao stresse oxidativo e nitrosativo (Tabela 1).

Tabela 1. Genes codificantes para proteínas envolvidas na destoxificação de ROS, no genoma de *C.difficile* P28.

Proteína	Gene codificante
Rubreritina	QSI_1519
Rubreritina	QSI_3944
Rubreritina	QSI_4729
Superóxido dismutase (Fe)	QSI_1250
Superóxido redutase	QSI_2365
Tiol peroxidase	QSI_0533
Tiol peroxidase	QSI_2088
Rubredoxina	QSI_2634
HMW_Rubredoxina*	QSI_2461
Proteína flavodiférrica	QSI_0497

O gene codificante para a rubreritina em estudo, situa-se no mesmo operão que contém um gene codificante para um regulador de stresse envolvendo peróxidos (Figura 11), o que pode mais uma vez indicar o envolvimento desta proteína na destoxificação de ROS, nomeadamente de H_2O_2 . Também a ausência do gene codificante para catalases fortalece a hipótese de que a rubreritina é uma enzima envolvida na eliminação de peróxido de hidrogénio.

*Esta proteína recebeu este nome por conter dois domínios: um domínio tipo rubredoxina e outro tipo NADH oxidoreductase (69).

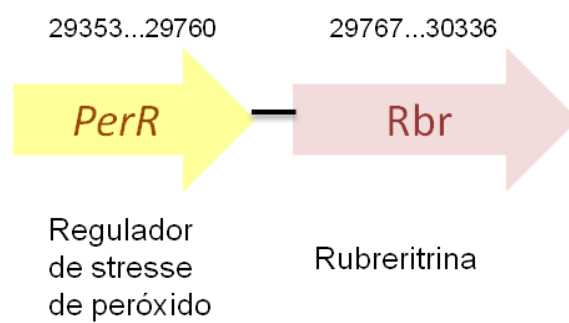


Figura 11. Representação do operão de *C. difficile* P28 contendo o gene codificante para a rubreritrina em estudo e para o regulador de stresse *PerR* (70).

Parte II

Materiais e Métodos

2. Materiais e Métodos

2.1 Seleção e clonagem de genes alvo

Os genes alvos foram selecionados tendo como base a presença de rubreritrinas e proteínas flavodiféricas e os respectivos dadores de electrões na mesma bactéria patogénica, através de comparação de sequências de aminoácidos depositadas em bases de dados, pesquisadas recorrendo ao programa BLAST (71). O alinhamento de sequências foi realizado recorrendo ao programa ClustalX2 (72). Com base neste alinhamento foi selecionada a bactéria *Clostridium difficile* P28, um comensal gastro intestinal que contém genes codificantes para todas as proteínas de interesse.

Os plasmídeos recombinantes (CaRbr, CaRd, CaRed e CaFDP) utilizados para a expressão dessas proteínas foram obtidos pela Genscript (www.genscript.com). Os genes codificantes para estas proteínas foram inseridos num vetor de expressão pET24a (+), indutível por isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e contendo um gene de resistência à canamicina, e expressos em *E.coli*. Os plasmídeos obtidos para expressão foram o pET24a (+)_CaRbr para a rubreritrina, o pET24a(+)_CaRd para a rubredoxina, o pET24a(+)_CaHMW_Rd para uma *high molecular weight* rubredoxina e para a proteína flavodiférica o pET24a (+)_CaFDP.

2.2 Transformação celular

A transformação consiste na introdução de ADN plasmídico, que possui um gene de resistência a determinado antibiótico, pelo método do choque térmico, numa célula hospedeira previamente tornada competente.

Os diferentes plasmídeos foram transformados individualmente em células de expressão *E.coli* BL21DE3GOLD. Cerca de 100 ng/μl de ADN plasmídico foram adicionados separadamente a uma alíquota de 100 μl de células competentes e colocou-se durante 30 minutos em gelo. Seguidamente procedeu-se ao choque térmico para permitir que o ADN plasmídico entre para dentro das células. O choque térmico foi realizado a 42°C durante 45 segundos seguido imediatamente de 2 minutos em gelo. De seguida adicionou-se 900 μl de meio Luria-Bertani também designado por Lysogeny broth (LB) (Tabela A1) e incubou-se 90 minutos, a 37°C e 350 rpm. Após a incubação referida, as células foram centrifugadas 5 minutos a 11325 g. Foram descartados 900 μl e o restante volume foi distribuído uniformemente em placas de Petri de meio LB Agar (Tabela A1) com 30 μg/mL de canamicina. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite, observando-se no dia seguinte, colónias isoladas. Todo o processo foi realizado em condições de esterilidade de forma a evitar contaminações.

2.3 Purificação de ADN

Os plasmídeos contendo os genes codificantes para as proteínas em estudo, foram transformados em células *E.coli* DH5 α para posterior purificação de ADN plasmídico. A purificação foi efetuada usando o kit “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega) e confirmada a integridade do ADN por eletroforese em gel de agarose a pH 6.5.

2.4 Testes de expressão das proteínas

Para testes de expressão das proteínas, os plasmídeos foram introduzidos em células de expressão *E.coli* BL21DE3GOLD.

Algumas colónias foram inoculadas em 100 mL de meio LB com 30 μ g/mL de canamicina. As células foram colocadas a 37°C e a densidade ótica (600 nm) foi seguida até atingir 0.4. Adicionou-se neste ponto 100 μ M de IPTG. Após 4 horas pararam-se os crescimentos e recolheram-se as células por centrifugação durante 10 minutos a 7155 g e ressuspenderam-se em tampão de lise (Tabela A2). A disrupção celular foi realizada usando a French Press (3 x 1000 psi). As células lisadas e não lisadas foram separadas por centrifugação, 10 minutos a 7155 g. De seguida, o sobrenadante foi centrifugado durante 45 minutos a 18111 g de forma a obter-se a fração solúvel (S) e a fração membranar (Mb). Os níveis de expressão de proteína foram analisados por eletroforese SDS-PAGE (Tabela A3) das células não induzidas (NI), induzidas (I), corpos de inclusão (CI), fração membranar (Mb) e solúvel (S).

2.5 Expressão de proteínas

A partir desta seção (2.5) trabalhou-se com os plasmídeos pET24a (+)_CdRbr, pET24a (+)_CdRd e pET24a (+)_CdHMW_Rd.

Foram preparados pré-inóculos de 100 mL em meio LB com 30 μ g/mL de canamicina, separadamente, a partir de colónias bacterianas da transformação dos plasmídeos referidos, e foram colocados numa estufa a 37°C durante a noite.

Os crescimentos bacterianos foram realizados a 37°C, com 150 rpm de agitação, em condições aeróbicas preparando 1 litro de meio mínimo M9 (Tabela A4) inoculado com 4% (v/v) de pré-inóculo e suplementado com 200 μ M de glucose, 400 μ M de FeSO $_4$ e 30 μ g/mL de canamicina. O crescimento bacteriano foi monitorizado por espectroscopia de Visível usando a absorvância ao comprimento de onda de 600 nm. Quando foi atingida a densidade ótica (600 nm) de 0.4 adicionou-se 100 μ M de IPTG. De seguida, incubou-se a 30°C a 120 rpm, durante a noite e na manhã seguinte parou-se os crescimentos e recolheu-se uma amostra de cada crescimento que corresponde às células induzidas (I). De seguida as células foram recolhidas, ressuspensas em tampão de lise e realizou-se o processo de lise na French Press (3 x 1000 psi). As células lisadas e células não lisadas separadas por centrifugação. As frações solúveis (S) foram recolhidas após centrifugação dos extratos celulares durante 45 minutos a 18111 g.

2.6 Purificação de proteínas

Todos os processos de purificação das proteínas foram realizados a 4°C, de forma a preservar a atividade enzimática das proteínas e protegendo-as da ação de proteases. O sistema utilizado foi o Akta-Prime Plus (GE Healthcare) e todos os tampões foram previamente filtrados (0,22 µm) e desarejados durante 10 minutos em linha de vácuo.

2.6.1 Rubreritrina

A fração solúvel resultante da expressão da rubreritrina foi aplicada numa coluna de troca aniónica Q-Sepharose Fast Flow (QS-FF) de 54 mL (XK 26/15, GE Healthcare), previamente equilibrada com 20 mM Tris-HCl pH 7,5. Foi aplicado um gradiente linear de 0 a 1M de NaCl a 2 mL/min usando o mesmo tampão.

A rubreritrina foi eluída a 0,4M de NaCl. A fração foi concentrada para 2 mL num concentrador Amicon com membrana com uma exclusão de 10 kDa e aplicada numa coluna de exclusão molecular Superdex-200 de 320 mL (XK 26/60, GE Healthcare), previamente equilibrada em 20 mM Tris-HCl pH 7,5 e 150 mM de NaCl. A purificação foi realizada no mesmo tampão com um fluxo de 0.5 mL/min e a rubreritrina foi eluída aos 270 minutos. A pureza da proteína da fração final foi confirmada por SDS-PAGE 15% e por espectroscopia de visível. A fração correspondente à proteína pura, concentrou-se (Amicon, 10 kDa) e armazenou-se em alíquotas a -20°C.

2.6.2 Rubredoxina

O processo de purificação da rubredoxina, foi realizado usando inicialmente a coluna de troca aniónica QS-FF referida anteriormente (eluída a 0,3 M de NaCl). Seguidamente, um passo cromatográfico de exclusão molecular numa coluna Superdex-30 de 120 mL (XK16/60, GE Healthcare), previamente equilibrada com 20 mM Tris-HCl pH 7,5 e 150 mM de NaCl. A purificação foi realizada a 0,5 mL/min, no mesmo tampão, e o tempo de eluição da rubredoxina foi de 100 minutos. A pureza da rubredoxina foi confirmada por SDS-PAGE 15% e por espectroscopia de visível. Concentrou-se a fração de proteína pura em concentrador (Amicon, 5 kDa) e distribuiu-se em alíquotas, que foram guardadas a -20°C.

2.6.3 *High molecular weight* rubredoxina

Não foi possível concluir com sucesso a purificação desta proteína (Ver seção 2.2).

2.7 Métodos analíticos

A concentração de proteína foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) usando a albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão (73) para o caso da rubreritrina. A concentração de rubredoxina foi determinada pela lei de Lambert-Beer $A = \epsilon \cdot l \cdot c$, em que o A corresponde à absorvância registada a 490 nm, o ϵ é a absortividade molar da rubredoxina a 490 nm ($7000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) (74) e l representa a distância que o feixe de luz atravessa (neste caso é de 1 cm).

A quantidade de ferro determinou-se pelo método (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) (TPTZ) (75) para a rubreritina e por espectroscopia de emissão atômica por plasma induzido (ICP-AES) para a rubredoxina. O conteúdo de zinco foi também determinado por ICP-AES para ambas as proteínas. O método de ICP-AES foi realizado no REQUIMTE, laboratório de análises da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

A massa molecular das proteínas foi estimada com base na sequência de aminoácidos recorrendo ao ExPASy (76) e por SDS-PAGE em comparação com marcadores padrão de baixa massa molecular.

2.8 Métodos espectroscópicos

Os espectros UV-Visível foram adquiridos nos espectrofotómetros de duplo feixe, Shimadzu UV-1700, Shimadzu UV-1800 e Perkin Elmer Lambda 35. Os espectros de EPR foram obtidos no espectrómetro Bruker EMX equipado com um criostato de fluxo contínuo de hélio ESR 900 da Oxford Instruments ou com um criostato de fluxo contínuo de azoto líquido, também da Oxford Instruments.

2.9 Ensaios de redução e oxidação

Os ensaios de redução e oxidação da rubreritina foram seguidos por UV-Visível, em condições anaeróbias a 25°C, usando um sistema contínuo de consumo de oxigénio (130 U/mL de catalase, 4 U/mL de glucose oxidase, 3 mM de glucose) e sob atmosfera de argon numa célula fechada.

A redução da rubreritina foi estudada usando dois sistemas: um sistema de transferência electrónica baseado no putativo dador de electrões fisiológico e a redução pela adição de um agente redutor.

Para a redução usando o primeiro sistema de transferência electrónica, as concentrações dos componentes necessários, NADH-redutase de *E.coli* (EcRed) e rubredoxina de *C.difficile* (CdRd) para as quais a transferência electrónica é mais eficiente, foram determinadas inicialmente. Seguiu-se a cinética ao comprimento de onda 490 nm ($\epsilon = 7000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (74), correspondente à absorvância característica do centro de ferro do domínio rubredoxina ($\text{Fe}(\text{Cys})_4$), na presença de 10 μM de CdRbr, 1 μM de CdRd, 250 nM de EcRed e 200 μM de NADH.

Este ensaio foi repetido, seguindo os espectros nos comprimentos de onda de 700 nm a 250 nm, em intervalos de 2 minutos durante 1 hora permitindo assim observar a alteração nos picos a comprimentos de onda característicos para esta proteína.

O ensaio de redução da rubreritina usando um agente redutor foi realizado na presença de 10 μM de rubreritina e seguido por espectroscopia UV-Visível adicionando gradualmente o redutor ditionito de sódio (preparado em 50 mM Tris-HCl pH 8,5). Os espectros foram traçados em intervalos de 2 minutos durante 2 horas. Após a redução total da proteína, a célula de reação foi exposta ao ar e continuou-se a traçar espectros de forma a observar a reoxidação da proteína.

A oxidação da proteína reduzida, na presença de 200 μM de NADH, 4 μM de CdRd, 1 μM de EcRed e 2 μM de CdRbr foi seguida pelo decréscimo da absorvância resultante do consumo do NADH a 340 nm ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (77), pela adição de diferentes concentrações de H_2O_2 (50, 100, 150 e 200 μM).

2.10 Interação do NO com a rubredoxina

Os ensaios foram realizados numa câmara anaeróbia (Coy) sob uma atmosfera de aproximadamente 95% de argon e 5% de hidrogénio e na presença do sistema contínuo de consumo de oxigénio (130 U/mL de catalase, 4 U/mL de glucose oxidase, 3 mM de glucose). Traçaram-se espectros UV-Visível durante 2 horas, em intervalos de 2 minutos, para cada ensaio.

Após a redução de 40 μM de CdRd pela adição de 250 nM de EcRed e quantidade estequiométrica de NADH, a cada ensaio foram adicionadas diferentes quantidades do composto dietilamina NOnoato (Sigma) (0, 0,02, 0,04, 0,08, 0,2, 0,4 e 2 mM), que liberta NO com um tempo de meia vida de 16 minutos em tampão fosfato, à temperatura ambiente.

Foram traçados espectros de RPE de amostras recolhidas no fim de cada ensaio.

Parte III

Resultados

3. Resultados

Pretendia-se seleccionar uma estirpe de *Clostridium* que contenha no genoma uma rubreritrina e uma proteína flavodiférrica, bem como os respetivos parceiros fisiológicos, nomeadamente uma rubredoxina e uma *high molecular weight* rubredoxina uma vez que a maioria dos estudos até agora realizados naquelas enzimas não foram realizados com os parceiros fisiológicos.

Pela comparação das sequências conhecidas de proteínas das famílias das proteínas de interesse com as sequências depositadas para genomas de *Clostridium* observou-se que a estirpe *Clostridium difficile* P28 contém genes codificantes para estas proteínas no seu genoma.

No entanto, este trabalho foi direccionado para a proteína de destoxificação de peróxido de hidrogénio, a rubreritrina e os seus parceiros fisiológicos rubredoxina e *high molecular weight* rubredoxina. Devido a problemas experimentais não foi possível utilizar a *high molecular weight* rubredoxina de *C. difficile*.

Realizou-se um alinhamento da sequência da rubreritrina seleccionada para estudo neste trabalho e sequências de rubrerittrinas pertencentes aos 3 domínios da vida (25) e constituídas pelos diferentes domínios estruturais (Figura 12).

A sequência da rubredoxina seleccionada foi alinhada com sequências de outras rubredoxinas conhecidas recorrendo ao Clustal X2 (72) (Figura 13).

Da análise destes alinhamentos, observou-se que todas as rubredoxinas seleccionadas são do tipo I e que as rubrerittrinas são do tipo canónico com todos os ligandos e domínios conservados e com o domínio rubredoxina no C-terminal, também com tamanho canónico.

		1	10	20	30
Rbr	<i>Clostridium difficile</i>	..	MNLGKTKTEKNLNEAFAGES	MARNKYTYYASK	
	<i>Clostridium perfringens</i>	..	MNLGSKTEKNLLTAFAGES	QARNKYTFYAEK	
	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	..	MKSLGKTKTAENLMKAFAGES	QARNRYTFYSNT	
	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	..	METPKNLLKGYIGES	LAI SRYQIYSSI	
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	..	MKSLKGSRTTEKNLTAFAGES	QARNRYNYFSGGQ	
Ngr	<i>Clostridium ramosum</i>	..	MTLKGTKTANLHMFAGES	QARNRYTYASI	
	<i>Trichomonas vaginalis</i>	..	MSIPIKGSRTTEKNLAIFAGES	MARTRYTFFASK	
	<i>Entamoeba dispar</i>	..	MATLINCLKAFAGES	QARNRYLIYAKT	
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	..	MKVR A QVPTVKNATN F NMVADSKTAVGST	LENLKA AIAGET	GAHAKYTAFAKA
	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	..	MKRFKQQM P VAALAALSFV A APAFADGPLKDQT	QKNLEAAMHGEA	YAH LKY LAYAEH
E	<i>Cyanophora paradoxa</i>	..	M G LNYNQEDFMG L DRFFQDAVSHNNT	DANAASSIEVEM	YECDCMYPTFAEI
	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	..	MTIIRNLL V AGALVGASLA G APAAFAETLNPQT	QKNLDAAMHGE	AFANLKYQAYAEH
	<i>Sulfolobus islandicus</i>	..	MKEIKGTKTAENLKHAFCGEE	A. MANRRYLYFARR	
	<i>Sulfolobus tokodaii</i>	..	MKDLGKTKTAENLKQF IGES	MANRRYLYFAKR	
	<i>Spirillum volutans</i>	..	MVTFQNXEA AFGGES	QAHIKYRYFAKI	
DRbr	<i>Acidianus ambivalens</i>	..	ML S YFSDKMDLKGTKTAENLKTGFI GES	MANRRYLYFAKK	
	<i>Campylobacter jejuni</i>	MRQYET Y KCQKCGNEV E VQNVGGGKLS C CGEEMKCI	TTDLTAVNLMKAFAGES	MARNKYDLFADV	

	40	50	*	*	60	70
<i>Clostridium difficile</i>	AKKDG Y V Q I S N I F E Q T A N N E K	E H A K L W F K L L H D				G M P D T V
<i>Clostridium perfringens</i>	ARREG Y N K I A D I F E E T A H N E M	A H A K I W F K F L N D G				T V G E T L
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	AKKEG Y V Q I S N I F L E T A E N E R	M H A K R F F K F L S E G L D D E A V E I N G A S Y P				T T L G D T K
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	A E A E K F I Y V A K Y F R E V I E N E K	K H A E I F A N L I K K L D I E P S E				V E V K A P I K F G T T A
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	AKKDG F V Q I S D I F A E T A D Q E R	E H A K R L F K F L E G G L E I V A A F P A G				I I A D T H
<i>Clostridium ramosum</i>	AKKEG F V Q I Q N I F L E T A N Q E K	E H A K R L M K L M N K D L A G E T L Y T D G N F P				V L L G T T A
<i>Trichomonas vaginalis</i>	AKKQG F E Q I S A I F L E T A E N E R	E H G K I F L K F L K E A N P E V H V Q M T I P S Y				T I G T T L
<i>Entamoeba dispar</i>	AKKEG L D V I A Q L F N E T A N Q E G	T H A R I L F E M I Q S L K K E G Q E T P K I E T A V P I D F G T T A				S A Y S C D
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	AREQY G E Q I A R L F E A T A A E L	I H G L E Y A L V A E M E P G Y E K P T V A A P				L A K S D E
<i>Burkholderia vietnamiensis</i>	ARKSG H P E I A K L F D E S A N V E A	N E H F A R E A E A L N				T I E S Q I D A V A S D S R G
<i>Cyanophora paradoxa</i>	ARRSG Q P E I G A M F D A I A K E E G	M H A Q L L T K L Y S E L V K D S A E T L E A K R L V S T I E S Q I D A V A S D S R G				L A K T D E
<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	ARKSG H P E I A K L F D E S A N V E A	N E H F A R E A D A L G				K P I G T L E
<i>Sulfolobus islandicus</i>	ADEEG Y P E I A G L L R S I A E G E T	A H A F G H L D F I R Q G G I G D P A T D				K P I G T L E
<i>Sulfolobus tokodaii</i>	ADEEG Y P E I A G L L R S I A E G E T	A H A F G H L D F I R Q G G L T D P A T D				A A E M T P A
<i>Spirillum volutans</i>	CREQGD E A T A K I F E E T A N Q E V	L H A F G H L D L I Y P				A A E M T P A
<i>Acidianus ambivalens</i>	ADEEG Y P D I A A V F R S I A E G E T	A H A F G H L D F I R Q G G L T D P A T D				K P I K T L E
<i>Campylobacter jejuni</i>	AEEEGW H A V A R H F R E A A E N E K	M H A R A E F K A Y H E I V D G K				L E V T T

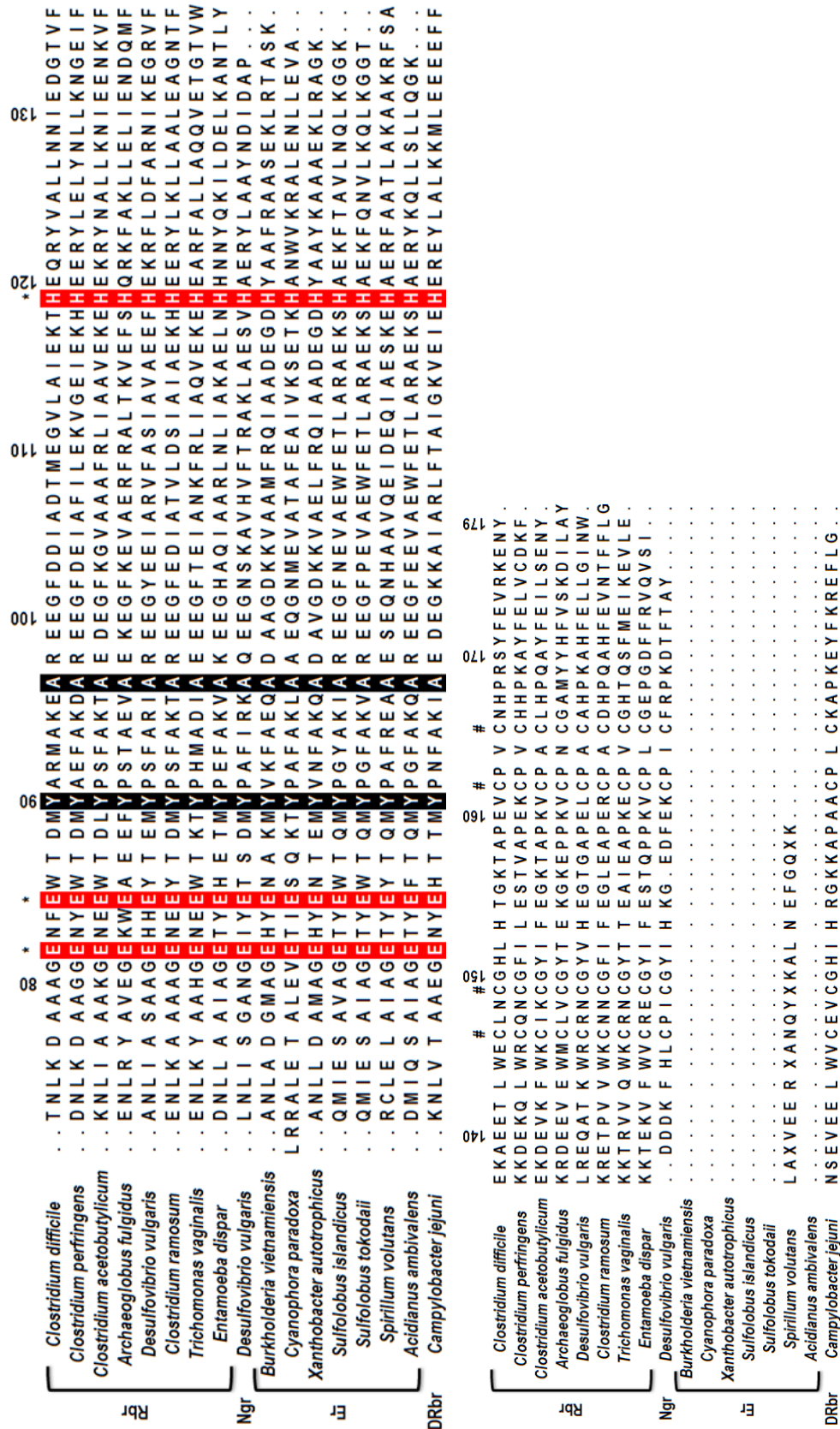


Figura 12. Alinhamento de seqüências de aminoácidos da Rbr de *Clostridium difficile* (Cd) P28 com rubretrinas identificadas em outros organismos. (% de identidade com Cd_Rbr, NCBI-GI): *Clostridium perfringens* str.13 (59%, 499319583); *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (52%, 499268472); *Clostridium ramosum* DSM 1402 (50%, 167754543); *Archaeoglobus fulgidus* (28%, 2649783); *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* DP4 (45%, 120601988); *Trichomonas vaginalis* G3 (44%, 154420781); *Entamoeba dispar* SAW760 (33%, 165904057); *Burkholderia vietnamiensis* G4 (19%, 134291384); *Cyanophora paradoxa* (14%, 1016189); *Xanthobacter autotrophicus* Py2 (21%, 154243812); *Sulfolobus islandicus* M.16.4 (26%, 238382159); *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *vulgaris* str. *Hildenborough* (23%, 46578436); *Sulfolobus tokodaii* (26%, 499289165); *Spirillum volutans* (23%, 3372506); *Acidianus ambivalens* (27%); *Campylobacter jejuni* (33%, 218561705). As caixas pretas representam os resíduos estritamente conservados. O símbolo * assinala os ligandos de ferro no centro binuclear; o símbolo # refere-se às cisteínas do centro rubredoxina. As caixas laranja representam as cisteínas do domínio desulfredoxina. A numeração corresponde à seqüência da rubretrina de *C. difficile*.



Figura 13. Alinhamento de seqüências de aminoácidos da Rd de *Clostridium difficile* (Cd) P28 com rubredoxinas identificadas em outros organismos. (% de identidade com Cd_Rd, NCBI-GI): *Clostridium perfringens* (75%, 565895140); *Moorella thermoacetica* (64%, 499712064); *Clostridium acetobutylicum* (74%, 499268670); *Desulfovibrio gigas* (69%, 545641871). As caixas pretas representam os resíduos estritamente conservados. O símbolo * assinala as cisteínas da rubredoxina. A numeração corresponde à seqüência da rubredoxina de *C. difficile*.

3.1 Expressão e purificação de proteínas

Os testes de expressão de proteína em meio LB a 37°C revelaram que as células escolhidas para a expressão, *E.Coli* BL21DE3GOLD, têm capacidade para expressar as proteínas de interesse em níveis elevados na fração solúvel (Figura 14).

Foram analisadas amostras de células não induzidas (NI), induzidas (I), corpos de inclusão (CI), fração solúvel (S) e membranas (Mb) em SDS-PAGE 15% (Figura 14).

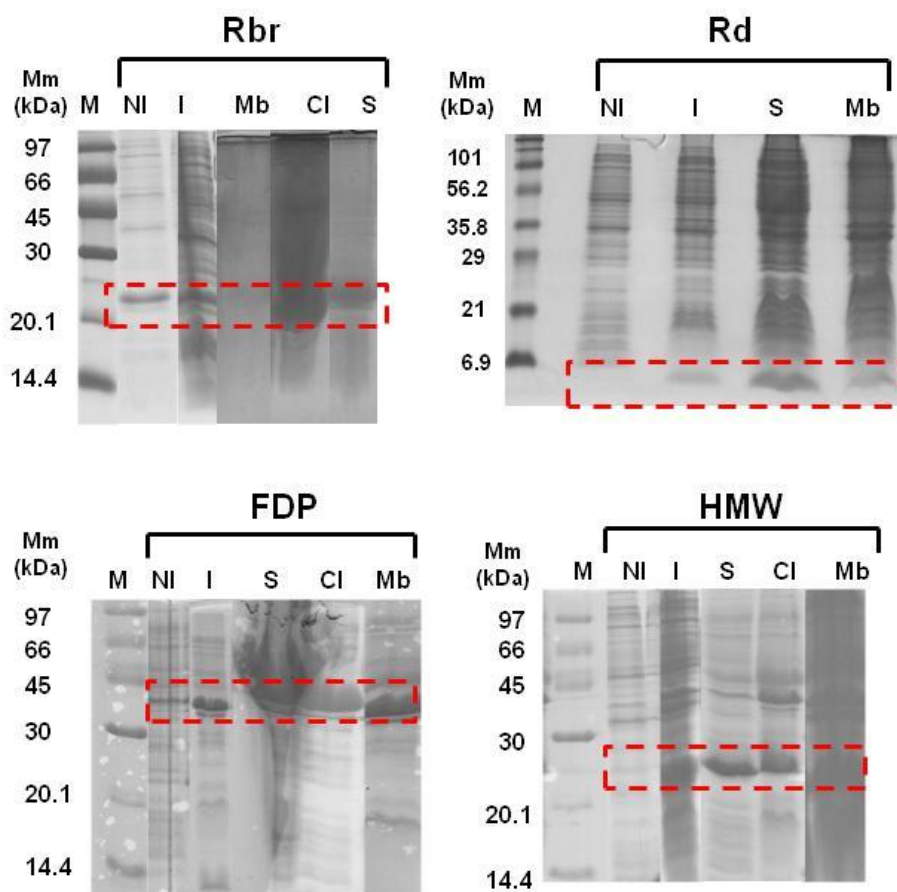


Figura 14. SDS-PAGE 15% das amostras de testes de expressão das proteínas.

Células não induzidas (NI), células induzidas (I), corpos de inclusão (CI), fração solúvel (S) e fração membranas (Mb); M representa os marcadores de baixa massa molecular em kDa.

Verificou-se que as bandas de expressão correspondem às massas moleculares esperadas: 20,4 kDa para a rubreritrina, 5,9 kDa para a rubredoxina, 44,9 kDa para a proteína flavodiférrica e 23,0 kDa para *high molecular weight*, tendo como base a sequência de aminoácidos.

Neste ponto do trabalho, selecionou-se a proteína envolvida no sistema de destoxificação de H_2O_2 (rubreritrina) e os parceiros fisiológicos, rubredoxina (*CdRd*) e *high molecular weight* rubredoxina (*CdHMW_Rd*).

Observou-se que a rubreritrina e a *high molecular weight* rubredoxina foram expressas em corpos de inclusão, ainda assim dada a elevada quantidade de proteína na fração solúvel, os corpos de inclusão foram descartados.

Para a obtenção de proteína para a caracterização bioquímica, espectroscópica e cinética foi necessário realizarem-se crescimentos, nas condições estabelecidas, num volume final de 4 litros para a rubreritrina (2 X 2 litros) e de 2 litros para a rubredoxina e 2 litros para a *high molecular weight* rubredoxina (2 x 1L). Após cada crescimento as respectivas amostras de células não induzidas, induzidas, corpos de inclusão, fração solúvel e membranas foram analisadas em SDS-PAGE de forma a confirmar a expressão das proteínas corretas.

A purificação foi seguida, em todos os passos, por SDS-PAGE e espectroscopia de UV-Visível, para avaliar a presença e o estado de pureza da proteína eluída em cada passo. A cor característica destas proteínas, uma cor avermelhada, permitiu facilmente identificar durante os passos de purificação, a fração em que a proteína foi eluída.

Para a purificação de rubreritrina, a fração solúvel foi centrifugada durante 10 minutos a 7155 g e foi de seguida aplicada numa coluna de troca aniônica QS-FF. A proteína foi eluída a 0,4 M de NaCl (Figura 15A). Foram separadas três frações (Q₁, Q₂ e Q₃), contendo a fração Q₂ a proteína de interesse. Desta forma, a fração Q₂ foi posteriormente concentrada para injeção numa coluna de filtração molecular S-200, em que o volume máximo de injeção é 1% do volume da coluna. Após este passo de purificação (Figura 15B) verificou-se que a proteína eluída aos 270 minutos correspondia à rubreritrina pura (Figura 15C).

O processo de purificação de rubredoxina foi semelhante ao anterior. No primeiro passo de purificação foram separadas 5 frações (Q_{r1}, Q_{r2}, Q_{r3}, Q_{r4}, Q_{r5}) que foram recolhidas a 0,3-0,4 M de NaCl na primeira coluna (Figura 16A). A fração Q_{r3}, foi concentrada (Amicon, 5 kDa) e aplicada numa coluna S-30 (Figura 14B). A fração eluída neste passo de purificação corresponde à rubredoxina pura (Figura 14C).

Realizou-se uma tabela de purificação de forma a visualizar a quantidade de proteína e a razão de absorvâncias determinadas em cada passo de purificação, para ambas as proteínas purificadas (Tabela 2).

A purificação da *high molecular weight* rubredoxina não foi concluída, devido à degradação da proteína. Foram testadas diferentes condições de purificação e recorreu-se à utilização de estabilizadores de proteínas e de inibidores de proteases, sem sucesso. Foi assim necessário recorrer a uma proteína semelhante já disponível no laboratório, uma NADH:rubredoxina oxidoreductase de *E.coli*.

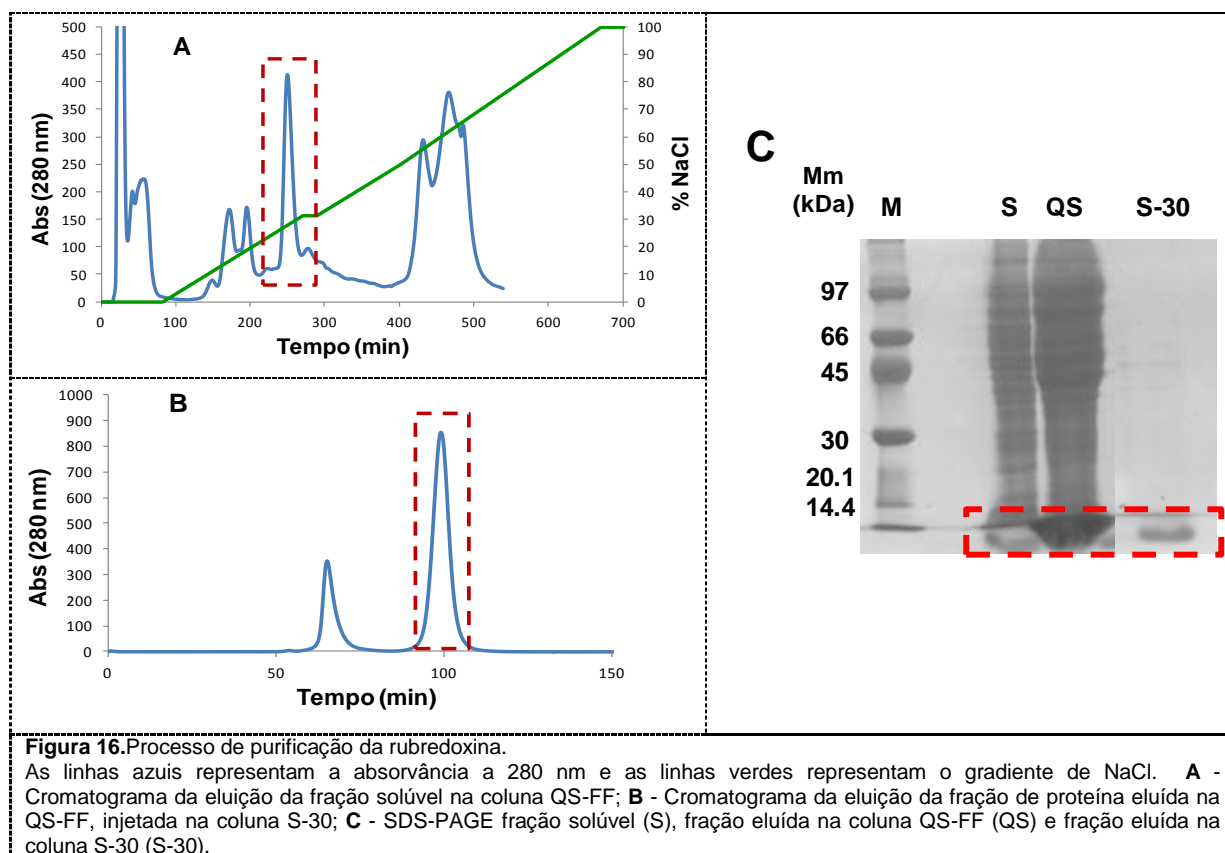
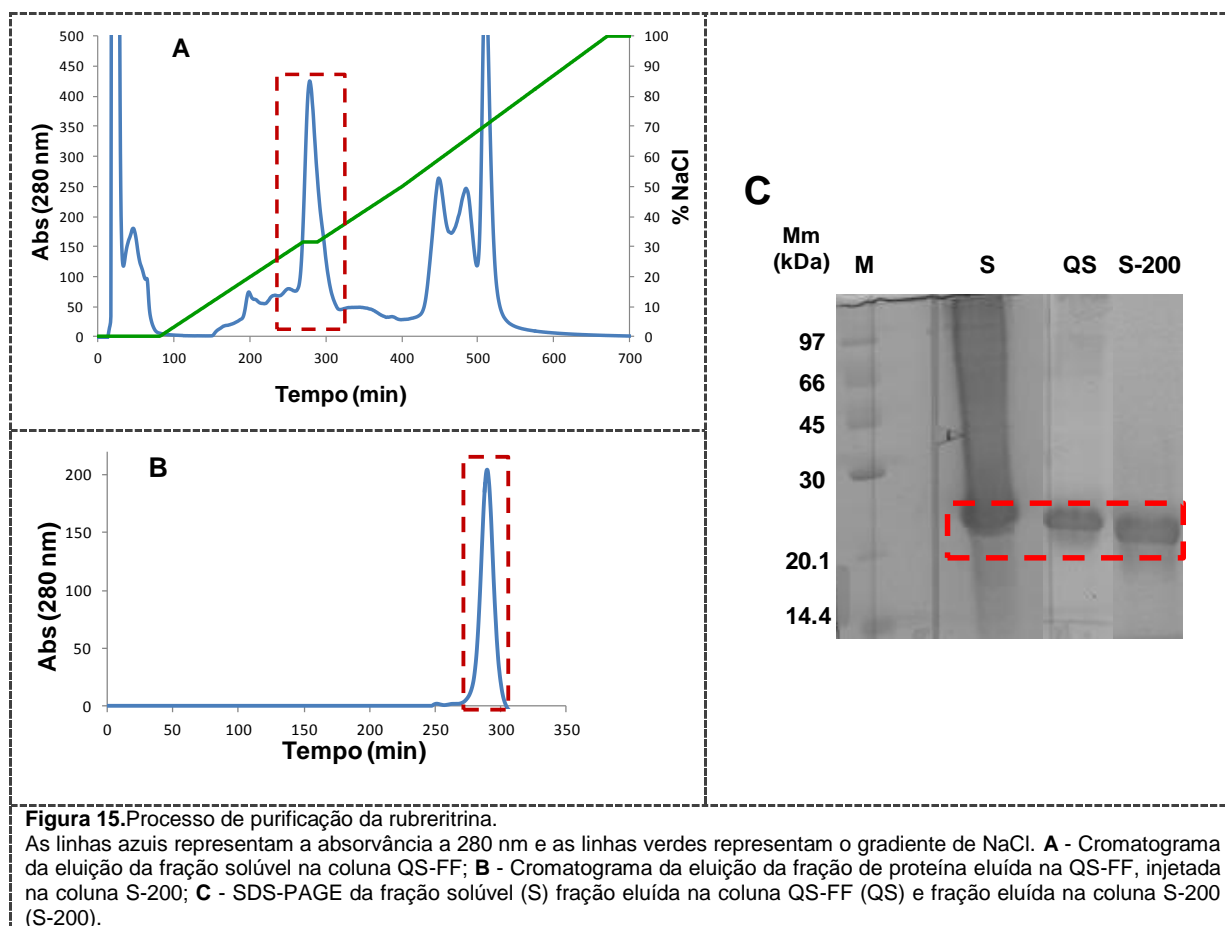


Tabela 2. Tabela de purificação da rubreritrina (CdRbr) e da rubredoxina (CdRd).

		Quantidade de proteína total (mg)	Volume (mL)	Razão (Abs _{280nm} /Abs _{493nm})	Rendimento (mg/L)
CdRbr	Q-Sepharose	58	60	9,1	3,75
	Superdex-200	15	10	7,3	
				(Abs _{280nm} /Abs _{490nm})	
CdRd	Q-Sepharose	55	50	3,2	13,5
	Superdex-30	27	15	2,9	

3.2 Quantificações

A quantidade de proteína foi estimada pelo método do BCA para a rubreritrina e pela Lei de Lambert-Beer para a rubredoxina (Tabela 3), utilizando a absorvidade molar da rubredoxina ($\epsilon_{490nm} = 7000 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (74).

Tabela 3. Registo da quantificação de proteína, ferro e zinco pelos diferentes métodos.

	Proteína (μM)		Ferro (Fe/monómero)		Zinco
	BCA	$\epsilon_{(490 \text{ nm})}$	TPTZ	ICP	ICP
CdRbr	60	---	1,6	---	0,03
CdRd	---	70	---	1	0,04

A quantificação de ferro da rubreritrina não está de acordo com o valor expectável, de 3 ferros/monómero. A quantificação de zinco está de acordo com o esperado, ausência de átomos de zinco.

As quantificações de metais na rubredoxina estão de acordo com o esperado, 1 átomo de ferro e ausência de zinco.

3.3 Espectroscopia UV-Visível

3.3.1 Espectros UV-VIS

As proteínas em estudo apresentam espectros UV-Visível característicos devido aos centros metálicos que as constituem. Assim sendo, foi possível seguir o grau de pureza em todos os passos de purificação. Apresentam-se os espectros das frações de rubreritrina e rubredoxina pura.

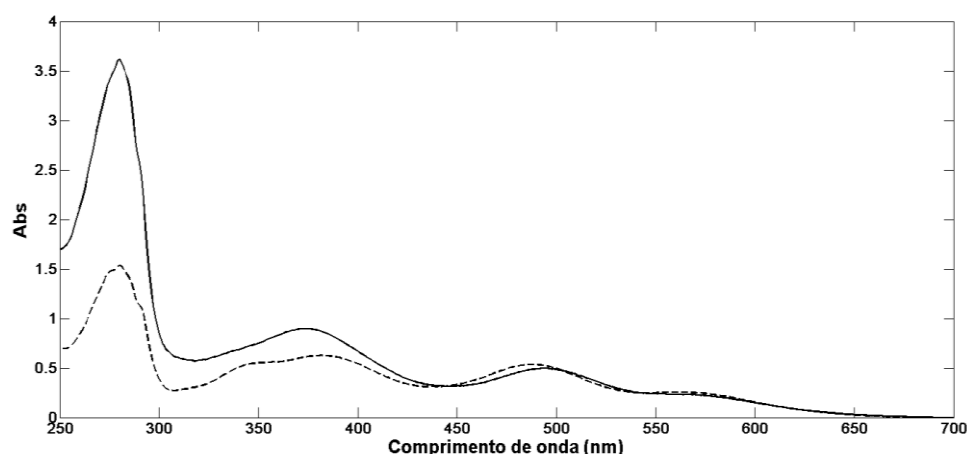


Figura 17. Espectros UV-Visível das frações finais de proteína em 20 mM Tris-HCl pH 7,5 e 150 mM NaCl. Linha cheia: rubreritrina oxidada; Linha tracejada: rubredoxina oxidada (adicionado o fator de multiplicação de 2,6 vezes)

Os picos característicos do espectro UV-Visível da rubreritrina (Figura 17) resultam da contribuição do centro $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ do domínio rubredoxina, observando-se picos a 493 nm e 560 nm, e do centro binuclear de ferro resultante num pico a 373 nm.

A absorvância do pico a 493 nm corresponde a cerca de metade da absorvância do pico a 373 nm, o que sugere a presença do centro binuclear, semelhante ao que é descrito para outras rubreritinas canônicas. Este centro provoca ligeiros desvios no espectro da rubreritrina, relativamente ao espectro de uma rubredoxina.

No entanto, é difícil detetar os centros diférricos na presença de outros cromóforos, pois apresentam baixa absorvidade molar (25) o que se traduz no aparecimento apenas de um pico característico de um centro binuclear de ferro.

O espectro da rubredoxina pura (Figura 17) apresenta caracteristicamente uma protuberância a 307 nm e picos definidos a 380 nm, 490 nm e 560 nm.

Com base nos espectros visível característicos, determinaram-se as razões das absorvâncias das proteínas puras (Tabela 4). Estes valores podem ser comparados com os descritos na literatura e assim funcionar também como indicadores do estado de pureza das frações, pois dá-nos a indicação da razão da quantidade de proteína total *versus* a contribuição de diferentes componentes da proteína, como o centro de ferro ou o domínio rubredoxina.

Tabela 4. Razões de absorvância dos picos característicos das proteínas.

	Abs₂₈₀/ Abs₄₉₃	Abs₃₇₃/Abs₅₆₀	Abs₄₉₃/Abs₅₆₀	Abs₃₇₃/Abs₄₉₃
CdRbr	7,3	4,3	2,4	1,8
	Abs₂₈₀/ Abs₄₉₀	Abs₃₈₀/Abs₅₆₀	Abs₃₈₀/Abs₄₉₀	Abs₄₉₀/Abs₅₆₀
CdRd	2,9	2,7	1,2	2,3

3.3.2 Evidência da presença do centro binuclear

A subtração do espectro da rubreritrina pelo espectro da rubredoxina (Figura 18) demonstra a contribuição do centro diférrico da rubreritrina refletindo-se num pico a 373 nm. O pico a 540 nm resulta da diferença nos centros rubredoxina entre as duas proteínas.

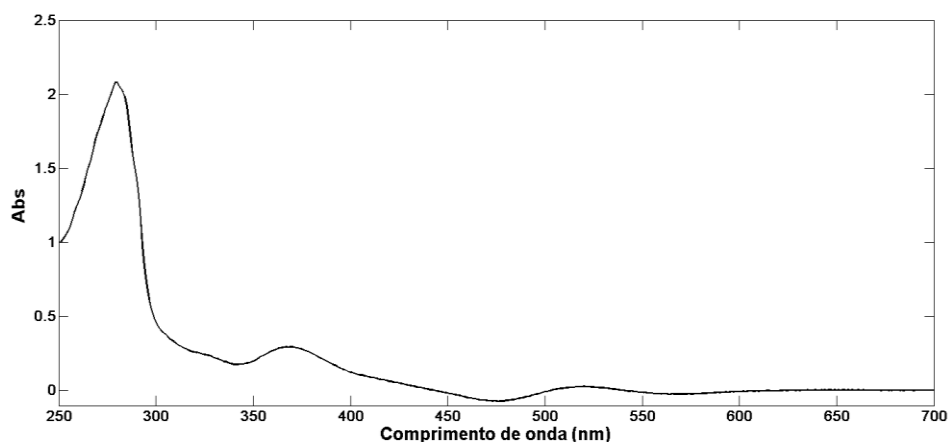


Figura 18. Espectro UV-Visível da subtração do espectro da rubreritrina pela rubredoxina.

3.3.3 Redução da rubreritrina com ditionito ou sistema enzimático

O ditionito de sódio é um agente redutor com a capacidade de provocar a passagem de Fe^{3+} a Fe^{2+} . Esta transferência electrónica observa-se pelo desaparecimento dos picos espectrais característicos dos centros de ferro, um centro rubredoxina contendo um átomo de ferro e um centro binuclear.

Para analisar a estabilidade da rubreritrina ao processo de redução foi realizada em condições anaeróbias, seguindo por espectroscopia UV-Visível a adição gradual de ditionito (Figura 19).

A redução total da proteína foi observada na presença de cerca de 30 μM de redutor. Após a redução, a proteína foi exposta ao ar de forma a reoxidar, e os picos característicos reapareceram o que demonstra a oxidação da rubreritrina pela exposição ao oxigénio. Isto indica-nos que esta proteína é estável à presença de agentes redutores.

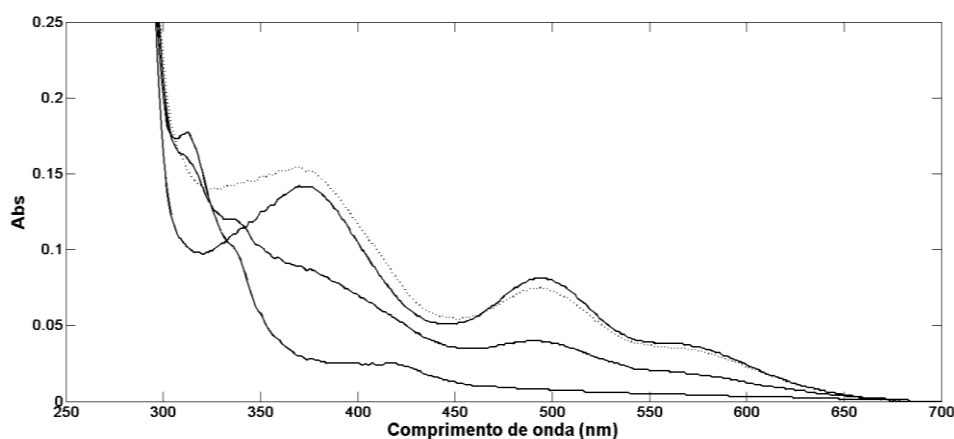


Figura 19. Redução gradual de 10 μM de CoRbr pela adição gradual de ditionito de sódio.

Os espectros apresentados correspondem ao intermédio da titulação e à proteína totalmente reduzida; O picotado corresponde à reoxidação da rubreritrina pela exposição ao ar.

Para testar a redução da rubreritrina pelo sistema enzimático constituído pela *high molecular weight rubredoxina* de *E.coli*, a rubredoxina de *C.difficile* e o NADH realizou-se um ensaio preliminar para averiguar a capacidade da *high molecular weight rubredoxina* de *E.coli* reduzir a rubredoxina de *C.difficile* usando o NADH como dador de electrões (Figura 20). Para tal seguiu-se cineticamente a absorvância a 480 nm, característica do centro rubredoxina.

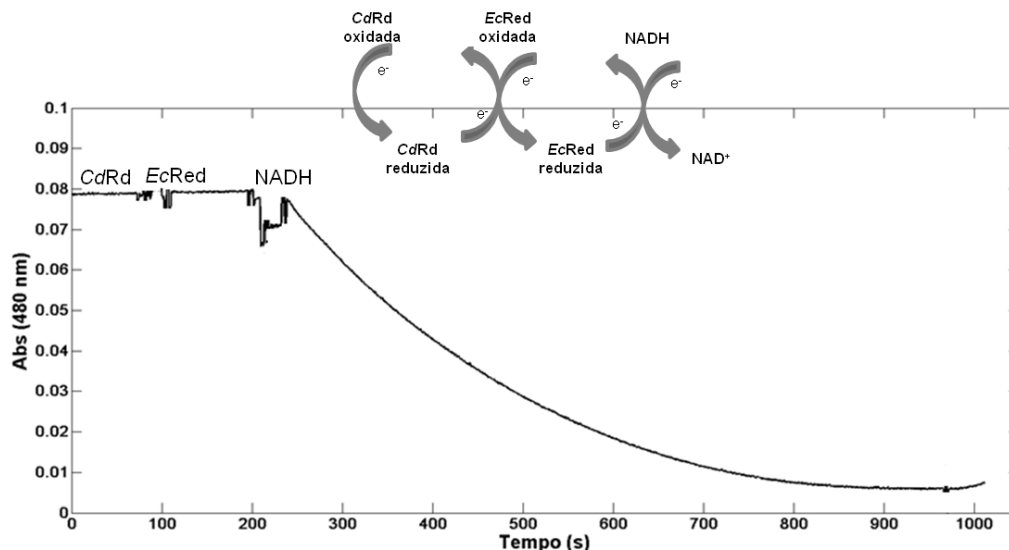


Figura 20. Redução de 1 µM CdRd na presença de 250 nM de EcRed e 200 µM de NADH. Cada componente foi adicionado sequencialmente como indicado no esquema.

Observou-se a redução referida e desta forma seguiu-se espectralmente a redução da rubreritrina usando o referido sistema de transferência. Este sistema permite uma transferência electrónica mais eficiente do que a redução com ditionito de sódio. O espectro da proteína reduzida caracteriza-se pelo desaparecimento dos picos característicos, resultante da redução dos centros de ferro (Figura 21).

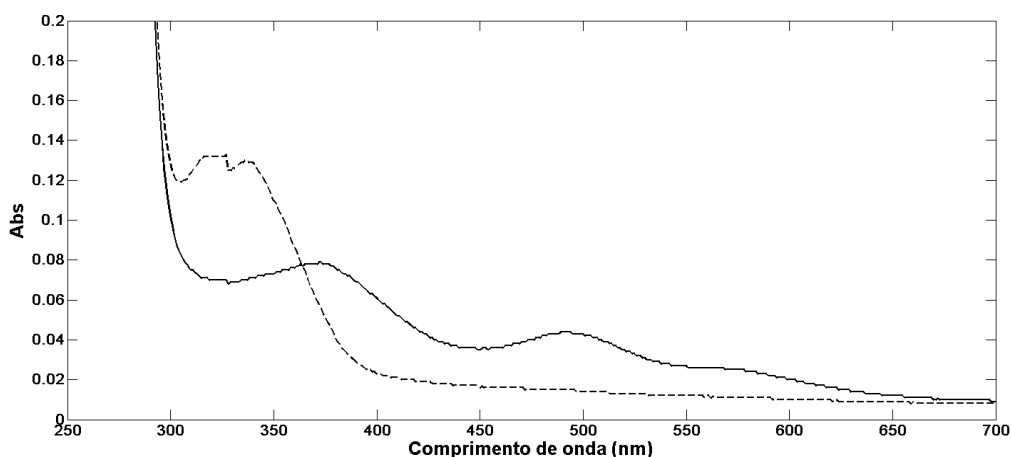


Figura 21. Redução gradual de 10 µM de CdRbr na presença 1 µM de CdRd, 250 nM de EcRed e 200 µM de NADH. O espectro da linha cheia corresponde à rubreritrina oxidada; a linha tracejada corresponde à rubreritrina totalmente reduzida.

A redução da rubreritrina, usando o sistema de transferência electrónica referido anteriormente foi seguida cineticamente, no comprimento de onda a 480 nm correspondente a um dos picos de absorção caraterístico do centro rubredoxina. A redução da proteína carateriza-se pela diminuição da absorvância nesse comprimento de onda (Figura 22).

Observou-se que é necessário a presença da rubredoxina para a redução da rubreritrina. Isto sugere que o centro rubredoxina é um parceiro fisiológico desta proteína. Determinou-se uma atividade de $1,7 \cdot 10^{-6} \mu\text{mol}^{-1}\text{min}^{-1}$.

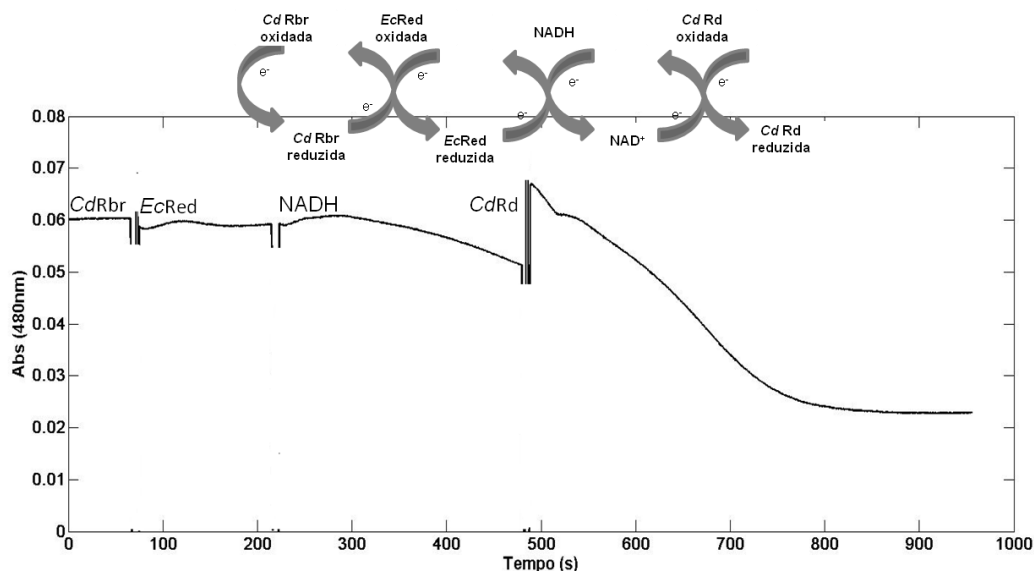


Figura 22. Redução de $10 \mu\text{M}$ de *CdRbr*, usando o sistema de transferência electrónica de 250 nM de *EcRed*, $200 \mu\text{M}$ de *NADH* e $1 \mu\text{M}$ de *CdRd*. Cada componente da reação foi sequencialmente adicionado como indicado no esquema.

3.3.4 Atividade H_2O_2 -redutase da rubreritrina

O papel fisiológico de proteínas da família rubreritrinas não foi ainda totalmente estabelecido, no entanto a maioria dos estudos relatados referenciam atividade H_2O_2 -redutase dependente da oxidação do *NADH* (25, 38, 40).

Seguiu-se a oxidação do *NADH* no comprimento de onda a 340 nm e determinou-se que a proporção da atividade $\text{NADH} : \text{H}_2\text{O}_2$ é de 1:1 (Figura 23), o que indica que o H_2O_2 é reduzido a água. No ensaio controlo, na ausência da rubreritrina, observou-se que não houve nenhum consumo de peróxido de hidrogénio pelos componentes da reação. Determinou-se uma atividade de $34,6 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{mg}^{-1}$, valor bastante superior ao determinado para outras rubreritrinas (25, 38).

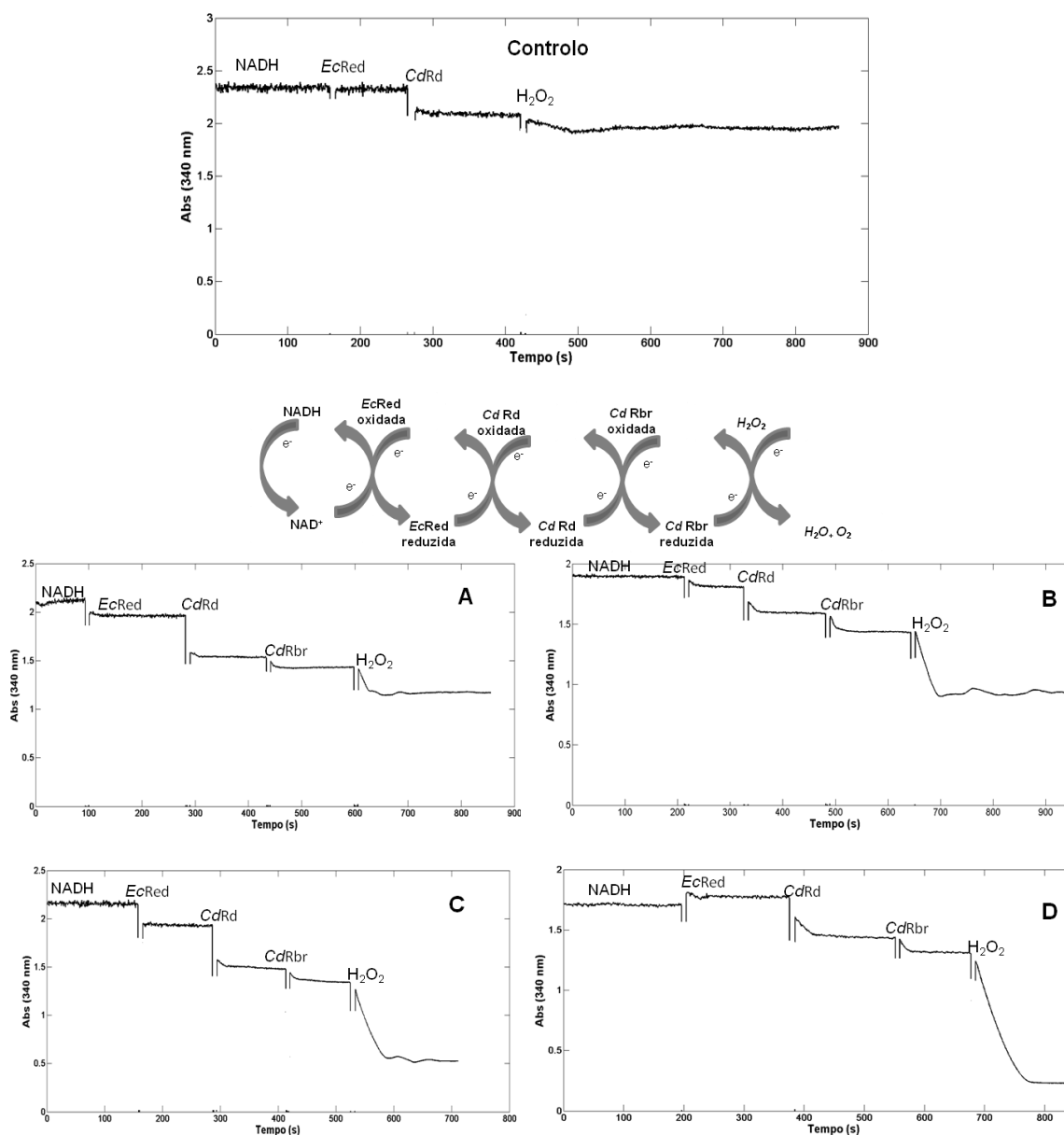


Figura 23. Atividade H₂O₂ redutase seguindo a oxidação de 200 μM de NADH a 340 nm. Foi adicionado H₂O₂ para 2 μM de CdRbr, 1 μM de EcRed e 4 μM de CdRd. Cada componente da reação foi sequencialmente adicionado como indicado no esquema. A: 50 μM de H₂O₂; B: 100 μM de H₂O₂; C: 150 μM de H₂O₂; D: 200 μM de H₂O₂

3.3.5 Interação do NO com a rubredoxina

A interação do óxido nítrico com a rubredoxina de *C.difficile* tentou proporcionar a compreensão do mecanismo que permite este tipo de proteínas interagir com NO.

Em projetos desenvolvidos no laboratório no estudo de proteínas flavodiférricas percebeu-se que proteínas desta família contendo domínios rubredoxina interagem de forma específica com o NO. Desde então estudaram-se várias rubredoxinas de diferentes organismos, contribuindo para estabelecer o mecanismo referido.

O estudo da interação do NO com a rubredoxina de *C.difficile*, realizou-se na presença do estado reduzido da proteína ($\text{Fe}^{2+}(\text{Cys})_4$) usando a *EcRed* e NADH como dadores de electrões. O NADH cede electrões à *EcRed*, que os transfere para a rubredoxina.

O espectro da rubredoxina de *C.difficile* reduzida (Figura 24) apresenta dois picos caraterísticos a 316 nm e 335 nm. O aumento da concentração de óxido nítrico, provoca o desaparecimento dos picos a 316 nm e 335 nm, e leva à formação de um pico a ~400 nm para concentrações de 0,04, 0,08 e 0,2 mM de NOoato (Figura 25A). Para concentrações superiores, 0,4 e 2 mM (Figura 25B), surge um pico deslocado para ~420 nm ou para 470 nm, respetivamente. Com 0,02 mM de NOoato não se observa aparecimento de nenhum pico (Figura 25B).

Os resultados destes ensaios mostram que a presença de NO provoca alterações na rubredoxina, mas não a reoxidação para a forma original.

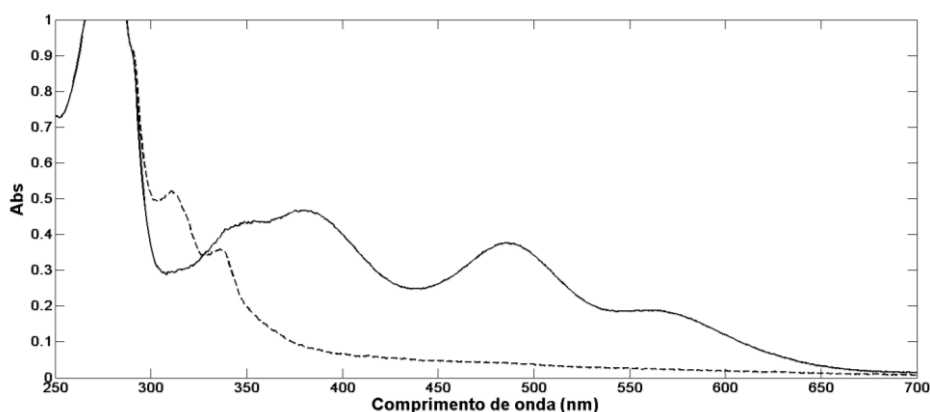


Figura 24. Espectros UV-Visível de 40 μM CdRd em 20 mM Tris-HCl pH 7,5 e 150 mM NaCl. Proteína oxidada (linha cheia) e reduzida (linha tracejada) pela adição de 250 nM de *EcRed* e 20 μM de NADH.

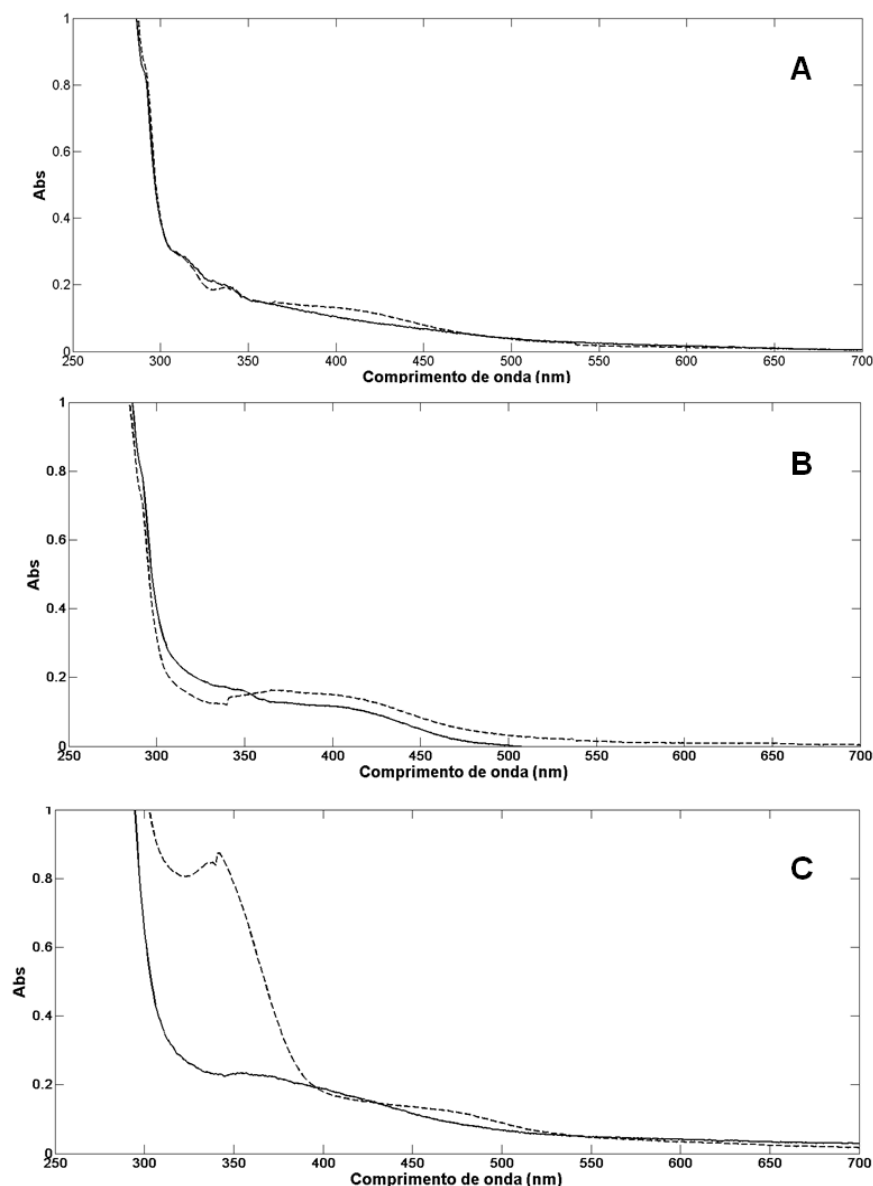


Figura 25. Espectros UV-Visível finais de rubredoxina reduzida com aumento da concentração de NOnoato, 2 horas após o início da reação.

A proteína em 20 mM Tris-HCl pH 7,5 e 150 mM NaCl, foi reduzida pela adição de 250 nM de *EcRed* e 20 μ M de NADH. **A-** adição de 0,02 mM (linha cheia), 0,04 mM (linha tracejada), **B-** 0,08 mM (linha tracejada) e 0,2 mM de NOnoato (linha cheia). **Figura B-** Adição de 0,4 mM (linha cheia) e 2 mM de NOnoato (linha tracejada).

Verificou-se que a reação da rubredoxina com NO leva à formação de um novo centro metálico. Por espectroscopia de RPE, este centro é muito possivelmente um complexo de ferro dinitrosilado do tipo $\text{FeCys}_2\text{NO}_2$, que se mantém ligado à proteína (Figura 26).

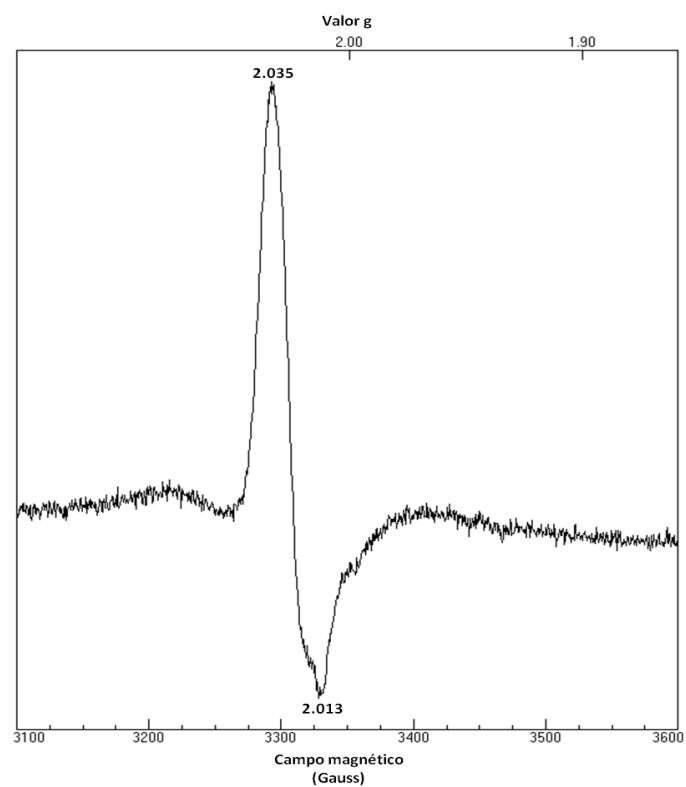


Figura 26. Espectro de RPE de rubredoxina reduzida estequiometricamente com NADH e na presença de *EcRed*, após adição de 0,08 mM de Nonoato. Temperatura= 16K; Frequência =9,35 GHz; Modulação completa de 1 Gauss; Potência de microondas de 2,0 mW

Parte IV

Díscussão

4. Discussão

4.1 Rubreritinas na destoxificação de ROS

As atuais formas de vida encontram um desafio na eliminação de espécies reativas de oxigênio. Estas espécies resultam da redução incompleta do oxigênio durante a respiração ou a exposição a fatores ambientais como os metais, o aumento da pressão do oxigênio ou luz, e podem provocar danos celulares causadores de graves patologias (1).

Existem assim enzimas especializadas para combater a toxicidades destas espécies, tais como dismutases do superóxido, peroxidases ou catalases.

Nos últimos anos foram estudadas enzimas que realizam destoxificação por mecanismos de redução, como as redutases do superóxido e as rubreritinas, pela sua importância como sistemas de destoxificação em microrganismos anaeróbios ou microaerofílicos.

As rubreritinas foram inicialmente descritas como tendo atividade peroxidásica, mas mais tarde percebeu-se que o mecanismo de redução do peróxido de hidrogênio pela rubreritina não ocorria da mesma forma que o realizado pelas peroxidases canônicas. O estudo de proteínas desta família descreveu-as como redutases do peróxido de hidrogênio, dependentes da oxidação do NAD(P)H (40). No entanto, os estudos em rubreritinas têm sido realizados usando sistemas de doadores de elétrons artificiais o que tem dificultado a compreensão da função destas proteínas.

Nesta tese, estudou-se uma rubreritina de *Clostridium difficile* P28, um anaeróbio estrito, comensal do trato gastrointestinal.

A estirpe selecionada contém o gene codificante para uma rubreritina canônica, constituída por um domínio diférrico contendo quatro hélices e um domínio rubredoxina, e para os seus parceiros fisiológicos rubredoxina e *high molecular weight rubredoxina*, permitindo assim a reconstituição da cadeia enzimática.

No entanto, devido a problemas experimentais no processo de purificação da *high molecular weight rubredoxina* de *C.difficile* referida, foi necessário que uma NADH:redutase de *E.Coli*, disponível no laboratório, fosse utilizada para os ensaios de caracterização da rubreritina de *C.difficile*.

O estudo desta proteína foi complementado com projetos desenvolvidos anteriormente no laboratório de acolhimento, na caracterização de uma eritrina, o tipo mais simples desta família (Figura 27) (78), tendo apenas o domínio de quatro hélices e uma desulfurubreritina, que contém três módulos distintos (Figura 27), nomeadamente domínios tipo desulforedoxina, as quatro hélices e rubredoxina.

A comparação do estudo destas proteínas permite assim compreender qual a função de cada domínio estrutural constituinte das proteínas da família das rubreritinas.

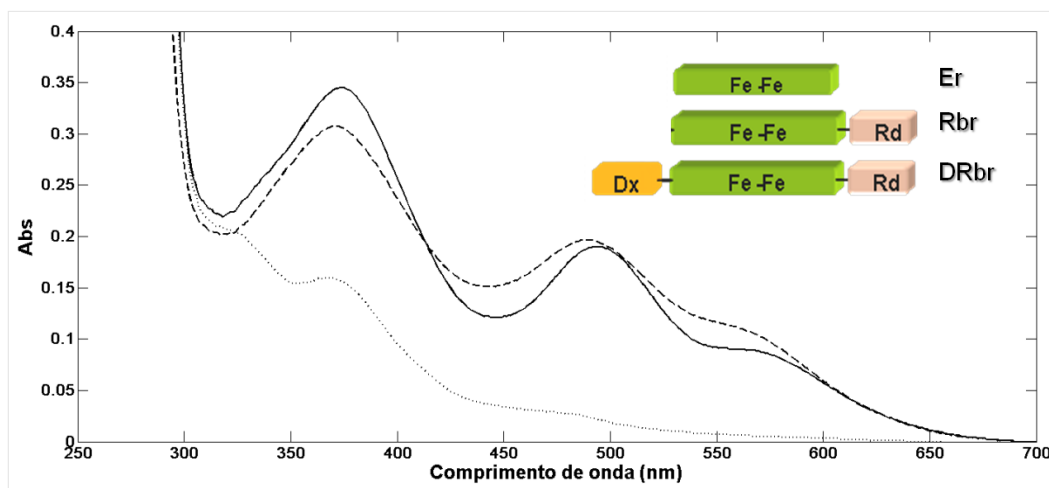


Figura 27. Espectros UV-Visível de proteínas da família das rubreritrinas. CdRbr (linha cheia), CjDRbr (linha tracejada) e AaEr (linha picotada).

Os estudos realizados em diversas rubreritrinas sugerem que o centro de dois ferros é o centro catalítico destas proteínas e os domínios adicionais, rubredoxina e/ou desulforedoxina funcionam como centros de transferência de electrões.

4.2 Alinhamento de sequências de aminoácidos de rubreritrinas e rubredoxinas

As rubredoxinas são proteínas pequenas, com cerca de 50 resíduos. Estas proteínas são encontradas na maioria em procariotas anaeróbios, mas também já foram identificadas algumas no domínio eucariota em organismos unicelulares (79). Domínios rubredoxina associados a outras proteínas foram encontrados maioritariamente em organismos anaeróbios. Foram alinhadas 5 sequências de aminoácidos representativas da distribuição de rubredoxinas do tipo I, ou seja entre as duas cisteínas de cada par existem dois aminoácidos e cada par é separado por cerca de 30 resíduos. A análise do alinhamento demonstra que a distância entre os dois pares de cisteínas, $C_{xx}C-X_{29}C_{xx}C$ é totalmente conservada. O alinhamento refere uma elevada percentagem de similaridade na sequência da rubredoxina de *C.difficile* e a sequência da proteína de *C.perfringes*, de 75 %. Além das cisteínas conservadas, existem perto do centro de ferro duas tirosinas Y4 e Y14, totalmente conservadas,

No alinhamento de sequências de aminoácidos de rubreritrinas foram escolhidas 17 sequências de rubreritrinas representativas da distribuição destas proteínas nos 3 reinos da vida e dos possíveis arranjos estruturais na família das rubreritrinas. A identidade das sequências analisadas com a rubreritrina de *C.difficile*, é mais elevada para sequências de proteínas de organismos do mesmo género (*C.perfringes*, *C. acetobutylicum* e *C.ramosum*).

A proteína de outro organismo da mesma ordem, *Desulfovibrio vulgaris* e a de um eucariota protista, apresentam identidades de 45% e 44%, respetivamente. Na comparação de sequências de eritrinas com a Rbr de *C.difficile*, as proteínas de organismos pertencentes ao reino archaea, *Sulfolobus (S.) islandicus*, *S. Tokodaii* e *Acidianus ambivalens*, são as que

apresentam identidades superiores, de 26% e 27%. A proteína de *Campylobacter (C.) jejuni*, constituída por um domínio adicional no N-terminal (DRbr) apresenta identidade de 33% com a proteína em comparação.

Observou-se que além das quatro cisteínas e duas histidinas ligantes do centro binuclear também as tirosinas Y26 e Y90 são estritamente conservadas na família das rubreritinas. O motivo de ligação do centro binuclear é: E19-(X)₃₂-E52-(X)₂-H55-(X)₂₆-E82-(X)₂-E85-(X)₃₁-E116-(X)₂-H119, de acordo com a numeração da Rbr de *C.difficile*.

Também as quatro cisteínas do domínio rubredoxina, são totalmente conservadas nas sequências selecionadas. O motivo de ligação do domínio rubredoxina é C146-(X)₂-C149-(X)₁₃-C162-(X)₂-C165.

4.3 Caracterização da rubreritina e rubredoxina de *C. difficile*

4.3.1 Caraterização da rubreritina

4.3.1.1 Caracterização Bioquímica

Pela análise da figura 14, verifica-se que a rubreritina foi expressa em células *E.Coli* BL21DE3GOLD, nas condições testadas. Alguma quantidade de proteína está localizada nos corpos de inclusão, ainda assim dada a elevada quantidade de proteína na fração solúvel não foi necessário solubilizar a proteína a partir dos corpos de inclusão.

O crescimento celular foi realizado em meio M9 suplementado com ferro. A presença do ferro é essencial para a incorporação do grupo prostético, ou seja, do ferro no centro binuclear e no centro rubredoxina.

O processo de purificação da rubreritina consistiu em apenas dois passos, o inicial numa passagem numa coluna de troca aniônica (QS-FF) seguida da aplicação numa filtração molecular (S-200). A primeira coluna é frequentemente utilizada para aplicação de extratos celulares. A coluna S-200 permite a separação de proteínas com massas moleculares entre 10000–600000 Da, por exclusão molecular.

A quantificação de ferro e zinco determinada por mole de monómero de proteína pura, corresponde a 1 ferro e ausência de zinco. Este resultado sugere-nos a ausência de ferro no centro binuclear.

Por outro lado, a subtração dos espectros da rubreritina pelo espectro da rubredoxina, na Figura 18, indica-nos a contribuição do centro diférrico da rubreritina, que se reflete num pico a 373 nm. Também a razão das absorvâncias do espectro da rubreritina, a 373 nm e 493 nm (~1,8) coincide com a razão demonstrada para outras rubreritinas, p.e. a rubreritina de *D.vulgaris* (80).

Uma causa desta discordância de resultados pode ser a utilização do método incorreto para determinação da concentração de proteína ou do método de quantificação de ferro.

No entanto, neste momento não está esclarecida a diferença entre a quantificação de ferro pelos métodos usados e a informação fornecida pelo espectro UV-Visível.

4.3.1.2 Caraterização espectroscópica

A rubreritina é constituída por dois domínios funcionais, um centro rubredoxina formado por um átomo de ferro coordenado por quatro cisteínas ($\text{Fe}(\text{Cys})_4$) e um centro binuclear de ferro do tipo μ -oxo histidina/carboxilato.

Os espectros UV-Visível de proteínas contendo centros diférricos apresentam dois picos entre os 300 e 400 nm (81) (Figura 28). No entanto, a absortividade molar do domínio rubredoxina, que também tem a capacidade de absorção nesta zona da luz visível, provoca alteração nos picos caraterísticos do centro diférrico (Figura 28). Assim, o espectro da rubreritina apresenta um pico a 373 nm que se deve ao centro rubredoxina mas também ao centro binuclear no estado férrico ($\text{Fe}^{3+} - \text{Fe}^{3+}$) (40, 82). Apresenta também absorção a 493 e 560 nm, caraterísticas do domínio rubredoxina (74, 83-84) (Figura 28).

Com base no espectro UV-Visível a razão $\text{Abs}_{280\text{nm}}/\text{Abs}_{493\text{nm}}$ de 7,3 foi determinada. Este valor pode auxiliar como indicador do estado de pureza da proteína, por comparação com valores descritos para proteínas semelhantes. De acordo com a literatura a razão $\text{Abs}_{280\text{nm}}/\text{Abs}_{494\text{nm}}$ é 7,7 para a rubreritina de *Desulfovibrio vulgaris* (85) e ~10 para a rubreritina de *Clostridium thermoaceticum* (42).

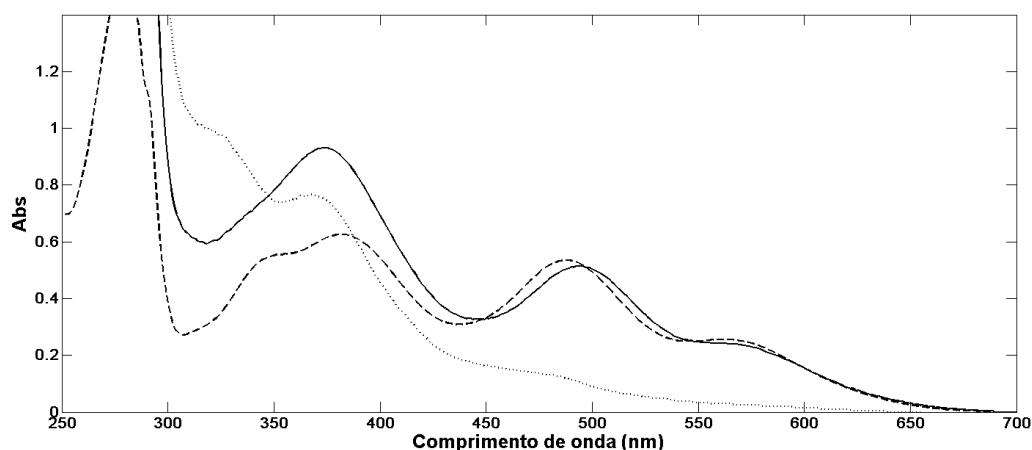


Figura 28. Espectros UV-Visível de proteínas de centros de ferro. AaEr (linha picotada), CoRbr (linha cheia) e CoRd (linha tracejada).

4.3.2 Caracterização da rubredoxina

4.3.2.1 Caraterização Bioquímica

A rubredoxina foi expressa em células *E.Coli* BL21DE3GOLD e nas condições testadas, como se observa na figura 14.

A rubredoxina apresenta elevados níveis de expressão nessas condições, verificando-se que se encontra quase na totalidade, na fração solúvel.

Para expressão da rubredoxina para posterior caraterização, realizaram-se crescimentos em meio M9 suplementado com ferro.

A rubredoxina foi purificada numa coluna de troca aniónica (QS-FF) e numa filtração molecular (S-30) indicada para separação de proteínas de baixa massa molecular, até 10000 Da.

A quantificação de ferro e zinco é concordante com o descrito na bibliografia para outras rubredoxinas.

4.3.2.2 Caraterização espectroscópica

O espectro visível da rubredoxina (Figura 17) carateriza-se por picos a 380, 490 e 560 nm resultante do centro de um átomo de ferro no estado férrico, coordenado por 4 cisteínas. A razão de Abs_{280nm}/Abs_{490nm} é de 2,9, igual ao proposto para a rubredoxina de *Chlorobium tepidum*, uma bactéria verde fixadora de azoto (84) e semelhante à razão determinada para a rubredoxina de *Desulfovibrio africanus*, de 2,2 (86).

4.3.2.3 Interação com NO

Verificou-se que a rubredoxina de *C.difficile*, tal como o modelo rubredoxina da proteína flavodiférrica de *E.coli*, reage com NO formando centros dinitrosilados. Para além de puderem constituir modelos para estes centros em proteínas ferro-enxofre mais complexas. Esta observação leva a novos problemas para a determinação da atividade NO redutase da FDP que usa a rubredoxina como dador de electrões.

4.4 Estudo das atividades da rubreritrina de *C.difficile*

A rubreritrina foi reduzida por adições sucessivas de ditionito de sódio, em condições anaeróbias (Figura 19). O ditionito de sódio é capa de reduzir uma enorme variedade de grupos funcionais. No caso estudado, o desaparecimento dos picos caraterísticos da rubreritrina, reflete a passagem dos átomos de ferro no estado férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}). Esta redução provoca o desaparecimento da cor rosa caraterística da rubreritrina, passando a transparente. Esta proteína consegue reoxidar após a exposição ao ar, o que demonstra a estabilidade da rubreritrina ao agente redutor.

Várias rubreritrinas são reduzidas pela presença deste agente redutor (25, 28) , tal como outras proteínas de centros de ferro.

Para tentar clarificar a função desta proteína ensaios de atividade foram realizados. Para tal a rubreritrina foi reduzida usando os seus putativos dadores fisiológicos de electrões, rubredoxina e high molecular weight rubredoxina. Os ensaios realizados demonstram que a rubreritrina só é reduzida na presença da rubredoxina de *C.difficile*, em conjunto com o sistema enzimático high molecular weight rubredoxina de *E.coli* e NADH (Figura 20).

Usando o sistema referido (Figura 21), determinou-se a atividade NADH:H₂O₂ redutase, de forma a compreender a sua atividade fisiológica. A atividade determinada, 34,6 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, é bastante superior ao descrito para outras rubreritrinas, como exemplo 0,99 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ da rubreritrina de *Clostridium acetobutylicum* (87) ou 0,12 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para a rubreritrina de *Entamoeba histolytica* (88). Pode-se concluir que a rubreritrina de *C.difficile* tem um papel relevante na destoxificação do peróxido de hidrogénio, o que se pode explicar pela ausência de outros sistemas de destoxificação desta espécie reativa neste microrganismo (89).

Em resumo, foram sobreexpressas e caracterizadas duas das proteínas de *C.difficile* P28 provavelmente envolvidas na resposta ao stresse oxidativo, como primeiro passo para a compreensão destes mecanismos neste importante patógeno humano.

Parte V

Conclusões

5. Conclusões

Este trabalho pretende contribuir para o estabelecimento da função de enzimas microbianas na defesa a espécies reativas de oxigénio. A proteína em estudo pertence a um microrganismo patogénico, principal causador de infeções gastro intestinais, pelo que é de elevada importância compreender os mecanismos de defesa desta estirpe, de forma a ser possível incidir sobre esses mecanismos impedindo assim o microrganismo de desenvolver a sua ação patogénica.

Foi observada a presença de rubreritinas, a proteína de estudo envolvida na destoxificação de espécies reativas de oxigénio, em outras estirpes de *Clostridium*, sendo esta proteína descrita como sendo essencial em organismos anaeróbios, geralmente deficientes em outros sistemas de destoxificação.

Escassos estudos foram realizados para esta estirpe patogénica; O estudo efetuado na rubreritina da estirpe de *C.difficile* P28, permitiu-nos concluir que esta proteína, com uma massa molecular de 20,4 kDa, depende dos seus parceiros fisiológicos, nomeadamente a rubredoxina e a *high molecular weight rubredoxina* para exercer a sua atividade fisiológica. A atividade peroxidase determinada para esta proteína é bastante superior ao descrito para outras rubreritinas o que reforça a ideia de que organismos anaeróbios recorrem a enzimas de destoxificação por redução de espécies reativas, sendo de extrema importância o sistema de destoxificação composto por rubreritinas.

No entanto, é necessário prosseguir o estudo *in vivo* da ação desta enzima de forma a compreender de que forma consegue atuar em condições de stresse celular.

Parte VI

Referências

6. Referências

1. Sawyer, D. T. (1988) O₂ - Who Would Have Imagined All the Biological Processes That Involve Oxygen, *Chemtech* 18, 369-375.
2. Severinghaus, J. W. (2003) Fire-air and dephlogistication - Revisionisms of oxygen's discovery, *Adv Exp Med Biol* 543, 7-19.
3. Cassebaum, H., and Schufle, J. A. (1975) Scheeles Priority for Discovery of Oxygen, *J Chem Educ* 52, 442-444.
4. Bertini, I., Briganti, F., Scozzafava, A., and Luchinat, C. (1996) Dioxygen activation in biodegradation reactions, *New J Chem* 20, 187-193.
5. Sawyer, D. T. (1988) Nature of the Bonding and Valence for the Oxygen and Copper in High-Temperature Superconductors, *J Phys Chem-Us* 92, 8-9.
6. Evans, P., and Halliwell, B. (1999) Free radicals and hearing - Cause, consequence, and criteria, *Ann Ny Acad Sci* 884, 19-40.
7. Valentine, J. S., Wertz, D. L., Lyons, T. J., Liou, L. L., Goto, J. J., and Gralla, E. B. (1998) The dark side of dioxygen biochemistry, *Curr Opin Chem Biol* 2, 253-262.
8. Henle, E. S., and Linn, S. (1997) Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron hydrogen peroxide, *Journal of Biological Chemistry* 272, 19095-19098.
9. Gutteridge, J. M. C. (1984) Lipid-Peroxidation Initiated by Superoxide-Dependent Hydroxyl Radicals Using Complexed Iron and Hydrogen-Peroxide, *Febs Letters* 172, 245-249.
10. Mccord, J. M., and Fridovic.I. (1969) Superoxide Dismutase-an Enzymic Function for Erythrocuprein, *Fed Proc* 28, 346-&.
11. McCord, J. M. (2000) The evolution of free radicals and oxidative stress, *Am J Med* 108, 652-659.
12. Keyer, K., Gort, A. S., and Imlay, J. A. (1995) Superoxide and the Production of Oxidative DNA-Damage, *J Bacteriol* 177, 6782-6790.
13. Messner, K. R., and Imlay, J. A. (2002) In vitro quantitation of biological superoxide and hydrogen peroxide generation, *Method Enzymol* 349, 354-361.
14. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1984) Role of Iron in Oxygen Radical Reactions, *Methods in Enzymology* 105, 47-56.
15. Imlay, J. A. (2002) How oxygen damages microbes: Oxygen tolerance and obligate anaerobiosis, *Advances in Microbial Physiology, Vol 46* 46, 111-153.
16. Small, D. M., and Gobe, G. C. (2013) *Oxidative Stress and Antioxidant Therapy in Chronic Kidney and Cardiovascular Disease*.
17. Crichton, R. R., and Ward, R. J. (2001) Iron homeostasis and iron toxicity, *J Inorg Biochem* 86, 36-36.
18. Holmes, K., Mulholland, F., Pearson, B. M., Pin, C., McNicholl-Kennedy, J., Ketley, J. M., and Wells, J. M. (2005) Campylobacter jejuni gene expression in response to iron limitation and the role of Fur, *Microbiology* 151, 243-257.
19. Mates, J. M., and Sanchez-Jimenez, F. (1999) Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes, *Front Biosci* 4, D339-345.
20. Mates, J. M., Perez-Gomez, C., and Nunez de Castro, I. (1999) Antioxidant enzymes and human diseases, *Clin Biochem* 32, 595-603.
21. Aga, R. G., and Hughes, M. N. (2008) The preparation and purification of NO gas and the use of NO releasers: the application of NO donors and other agents of nitrosative stress in biological systems, *Methods Enzymol* 436, 35-48.
22. Goncalves, V. L., Saraiva, L. M., and Teixeira, M. (2011) Gene expression study of the flavodi-iron proteins from the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC6803, *Biochem Soc Trans* 39, 216-218.
23. Nunoshiba, T., deRojas-Walker, T., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R., and Demple, B. (1993) Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9993-9997.
24. Hughes, M. N. (2008) Chemistry of nitric oxide and related species, *Methods Enzymol* 436, 3-19.

25. Pinto, A. F., Todorovic, S., Hildebrandt, P., Yamazaki, M., Amano, F., Igimi, S., Romao, C. V., and Teixeira, M. (2011) Desulforubrythrin from *Campylobacter jejuni*, a novel multidomain protein, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 16, 501-510.
26. Bonomi, F., Kurtz, D. M., and Cui, X. Y. (1996) Ferroxidase activity of recombinant *Desulfovibrio vulgaris* rubrerythrin, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 1, 67-72.
27. Kawasaki, S., Ishikura, J., Watamura, Y., and Niimura, Y. (2004) Identification of O-2-induced peptides in an obligatory anaerobe, *Clostridium acetobutylicum*, *Febs Letters* 571, 21-25.
28. Legall, J., Prickril, B. C., Moura, I., Xavier, A. V., Moura, J. J. G., and Huynh, B. H. (1988) Isolation and Characterization of Rubrerythrin, a Non-Heme Iron Protein from *Desulfovibrio-Vulgaris* That Contains Rubredoxin Centers and a Hemerythrin-Like Binuclear Iron Cluster, *Biochemistry* 27, 1636-1642.
29. Carrilho, J. P., Romão, C. V., and Teixeira, M. (2014) Diiron four-helix-bundle proteins in oxygen and hydrogen peroxide detoxification, *BBA- Bioenergetics* 1837.
30. Kurtz, D. M. (2006) Avoiding high-valent iron intermediates: Superoxide reductase and rubrerythrin, *J Inorg Biochem* 100, 679-693.
31. Wildschut, J. D., Lang, R. M., Voordouw, J. K., and Voordouw, G. (2006) Rubredoxin: Oxygen oxidoreductase enhances survival of *Desulfovibrio vulgatis* Hildenborough under microaerophilic conditions, *J Bacteriol* 188, 6253-6260.
32. Sztukowska, M., Bugno, M., Potempa, J., Travis, J., and Kurtz, D. M. (2002) Role of rubrerythrin in the oxidative stress response of *Porphyromonas gingivalis*, *Mol Microbiol* 44, 479-488.
33. Lumpio, H. L., Shenvi, N. V., Summers, A. O., Voordouw, G., and Kurtz, D. M. (2001) Rubrerythrin and rubredoxin oxidoreductase in *Desulfovibrio vulgaris*: a novel oxidative stress protection system, *J Bacteriol* 183, 101-108.
34. Fournier, M., Aubert, C., Dermoun, Z., Durand, M. C., Moinier, D., and Dolla, A. (2006) Response of the anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough to oxidative conditions: proteome and transcript analysis, *Biochimie* 88, 85-94.
35. Yamasaki, M., Igimi, S., Katayama, Y., Yamamoto, S., and Amano, F. (2004) Identification of an oxidative stress-sensitive protein from *Campylobacter jejuni*, homologous to rubredoxin oxidoreductase/rubrerythrin, *Fems Microbiol Lett* 235, 57-63.
36. Mydel, P., Takahashi, Y., Yumoto, H., Sztukowska, M., Kubica, M., Gibson, F. C., Kurtz, D. M., Travis, J., Collins, L. V., Nguyen, K. A., Genco, C. A., and Potempa, J. (2006) Roles of the host oxidative immune response and bacterial antioxidant rubrerythrin during *Porphyromonas gingivalis* infection, *Plos Pathog* 2, 712-725.
37. Hillmann, F., Fischer, R. J., Saint-Prix, F., Girbal, L., and Bahl, H. (2008) PerR acts as a switch for oxygen tolerance in the strict anaerobe *Clostridium acetobutylicum*, *Mol Microbiol* 68, 848-860.
38. Weinberg, M. V., Jenney, F. E., Cui, X. Y., and Adams, M. W. W. (2004) Rubrerythrin from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* is a rubredoxin-dependent, iron-containing peroxidase, *J Bacteriol* 186, 7888-7895.
39. Kawasaki, S., Sakai, Y., Takahashi, T., Suzuki, I., and Niimura, Y. (2009) O-2 and Reactive Oxygen Species Detoxification Complex, Composed of O-2-Responsive NADH:Rubredoxin Oxidoreductase-Flavoprotein A2-Desulfoferrodoxin Operon Enzymes, Rubperoxin, and Rubredoxin, in *Clostridium acetobutylicum*, *Appl Environ Microb* 75, 1021-1029.
40. Coulter, E. D., Shenvi, N. V., and Kurtz, D. M. (1999) NADH peroxidase activity of rubrerythrin, *Biochem Bioph Res Co* 255, 317-323.
41. Wildschut, J. D., Lang, R. M., Voordouw, J. K., and Voordouw, G. (2006) Rubredoxin: Oxygen oxidoreductase enhances survival of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough under microaerophilic conditions, *J Bacteriol* 188, 6253-6260.
42. Das, A., Coulter, E. D., Kurtz, D. M., and Ljungdahl, L. G. (2001) Five-gene cluster in *Clostridium thermoaceticum* consisting of two divergent operons encoding rubredoxin oxidoreductase-rubredoxin and rubrerythrin-type A flavoprotein-high-molecular-weight rubredoxin, *J Bacteriol* 183, 1560-1567.
43. Paredes, C. J., Alsaker, K. V., and Papoutsakis, E. T. (2005) A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology, *Nat Rev Microbiol* 3, 969-978.
44. Bruggemann, H., and Gottschalk, G. (2009) *Clostridia: Molecular Biology in the Post-genomic Era*.
45. Popoff, M. R., and Bouvet, P. (2013) Genetic characteristics of toxigenic *Clostridia* and toxin gene evolution, *Toxicon* 75, 63-89.

46. Rodriguez-Pardo, D., Mirelis, B., and Navarro, F. (2013) Infections caused by *Clostridium difficile*, *Enferm Infec Micr Cl* 31, 254-263.
47. Bartlett, J. G. (2006) Narrative review: The new epidemic of *Clostridium difficile*-associated enteric disease, *Ann Intern Med* 145, 758-764.
48. Freeman, J., Bauer, M. P., Baines, S. D., Corver, J., Fawley, W. N., Goorhuis, B., Kuijper, E. J., and Wilcox, M. H. (2010) The Changing Epidemiology of *Clostridium difficile* Infections, *Clin Microbiol Rev* 23, 529-+.
49. Paredes-Sabja, D., Bond, C., Carman, R. J., Setlow, P., and Sarker, M. R. (2008) Germination of spores of *Clostridium difficile* strains, including isolates from a hospital outbreak of *Clostridium difficile*-associated disease (CDAD), *Microbiol-Sgm* 154, 2241-2250.
50. Clements, A. C. A., Magalhaes, R. J. S., Tatem, A. J., Paterson, D. L., and Riley, T. V. (2010) *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: assessing the risks of further worldwide spread, *Lancet Infect Dis* 10, 395-404.
51. Hammond, G. A., and Johnson, J. L. (1995) The Toxigenic Element of *Clostridium-Difficile* Strain Vpi-10463, *Microb Pathogenesis* 19, 203-213.
52. Lyras, D., O'Connor, J. R., Howarth, P. M., Sambol, S. P., Carter, G. P., Phumoonna, T., Poon, R., Adams, V., Vedantam, G., Johnson, S., Gerding, D. N., and Rood, J. I. (2009) Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*, *Nature* 458, 1176-1181.
53. Redelings, M. D., Sorvillo, F., and Mascola, L. (2007) Increase in *Clostridium difficile*-related mortality rates, United States, 1999-2004, *Emerg Infect Dis* 13, 1417-1419.
54. Matamouros, S., England, P., and Dupuy, B. (2007) *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC, *Mol Microbiol* 64, 1274-1288.
55. Spigaglia, P., and Mastrantonio, P. (2002) Molecular analysis of the pathogenicity locus and polymorphism in the putative negative regulator of toxin production (TcdC) among *Clostridium difficile* clinical isolates, *J Clin Microbiol* 40, 3470-3475.
56. Shen, A. (2012) *Clostridium difficile* Toxins: Mediators of Inflammation, *J Innate Immun* 4, 149-158.
57. McQuade, R., Roxas, B., Viswanathan, V. K., and Vedantam, G. (2012) *Clostridium difficile* clinical isolates exhibit variable susceptibility and proteome alterations upon exposure to mammalian cationic antimicrobial peptides, *Anaerobe* 18, 614-620.
58. Kelly, C. P., and LaMont, J. T. (2008) *Clostridium difficile* - More difficult than ever, *New Engl J Med* 359.
59. Ramanathan, M., Pinhal-Enfield, G., Hao, I., and Leibovich, S. J. (2007) Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in macrophages by adenosine A(2A) receptor agonists and endotoxin involves transcriptional regulation via the hypoxia response element in the VEGF promoter, *Mol Biol Cell* 18, 14-23.
60. Melillo, G., Musso, T., Sica, A., Taylor, L. S., Cox, G. W., and Varesio, L. (1995) A Hypoxia-Responsive Element Mediates a Novel Pathway of Activation of the Inducible Nitric-Oxide Synthase Promoter, *J Exp Med* 182, 1683-1693.
61. Weidemann, A., and Johnson, R. S. (2008) Biology of HIF-1 alpha, *Cell Death Differ* 15, 621-627.
62. Colgan, S. P., and Eltzschig, H. K. (2012) Adenosine and Hypoxia-Inducible Factor Signaling in Intestinal Injury and Recovery, *Annu Rev Physiol* 74, 153-175.
63. Dehne, N., and Brune, B. (2009) HIF-1 in the inflammatory microenvironment, *Exp Cell Res* 315, 1791-1797.
64. Brune, B., and Zhou, J. (2007) Nitric oxide and superoxide: Interference with hypoxic signaling, *Cardiovasc Res* 75, 275-282.
65. Janoir, C., Deneve, C., Bouttier, S., Barbut, F., Hoys, S., Caleechum, L., Chapeton-Montes, D., Pereira, F. C., Henriques, A. O., Collignon, A., Monot, M., and Dupuy, B. (2013) Adaptive strategies and pathogenesis of *Clostridium difficile* from in vivo transcriptomics, *Infect Immun* 81, 3757-3769.
66. Cernat, R. C., and Scott, K. P. (2012) Evaluation of novel assays to assess the influence of different iron sources on the growth of *Clostridium difficile*, *Anaerobe* 18, 298-304.
67. Cartron, M. L., Maddocks, S., Gillingham, P., Craven, C. J., and Andrews, S. C. (2006) Feo--transport of ferrous iron into bacteria, *Biometals* 19, 143-157.
68. Mishra, S., and Imlay, J. (2012) Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide?, *Arch Biochem Biophys* 525, 145-160.
69. Silaghi-Dumitrescu, R., Coulter, E. D., Das, A., Ljungdahl, L. G., Jameson, G. N., Huynh, B. H., and Kurtz, D. M., Jr. (2003) A flavodiiron protein and high molecular

- weight rubredoxin from *Moorella thermoacetica* with nitric oxide reductase activity, *Biochemistry-Us* 42, 2806-2815.
70. Wattam, A. R., Abraham, D., Dalay, O., Disz, T. L., Driscoll, T., Gabbard, J. L., Gillespie, J. J., Gough, R., Hix, D., Kenyon, R., Machi, D., Mao, C., Nordberg, E. K., Olson, R., Overbeek, R., Pusch, G. D., Shukla, M., Schulman, J., Stevens, R. L., Sullivan, D. E., Vonstein, V., Warren, A., Will, R., Wilson, M. J., Yoo, H. S., Zhang, C., Zhang, Y., and Sobral, B. W. (2014) PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource, *Nucleic Acids Res* 42, D581-591.
 71. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) Basic Local Alignment Search Tool, *J Mol Biol* 215, 403-410.
 72. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. (2007) Clustal W and clustal X version 2.0, *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
 73. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid, *Anal Biochem* 150, 76-85.
 74. Auchere, F., Sikkink, R., Cordas, C., Raleiras, P., Tavares, P., Moura, I., and Moura, J. J. G. (2004) Overexpression and purification of *Treponema pallidum* rubredoxin; kinetic evidence for a superoxide-mediated electron transfer with the superoxide reductase neelaredoxin, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 9, 839-849.
 75. Fischer, D. S., and Price, D. C. (1964) A Simple Serum Iron Method Using the New Sensitive Chromogen Tripyridyl-S-Triazine, *Clin Chem* 10, 21-31.
 76. Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Bairoch, A., Sanchez, J. C., Williams, K. L., Appel, R. D., and Hochstrasser, D. F. (1999) Protein identification and analysis tools in the ExPASy server, *Methods Mol Biol* 112, 531-552.
 77. Gomes, C. M., Vicente, J. B., Wasserfallen, A., and Teixeira, M. (2000) Spectroscopic studies and characterization of a novel electron-transfer chain from *Escherichia coli* involving a flavorubredoxin and its flavoprotein reductase partner, *Biochemistry* 39, 16230-16237.
 78. Carrilho, J. P., Matias, P. M., Pinto, L., Ribeiro, M., Teixeira, M., and Romão, C. V. (2010) Biochemical and structural characterization of *Acidianus ambivalens* erythrin, ITQB, Oeiras.
 79. Wastl, J., Duin, E. C., Iuzzolino, L., Dorner, W., Link, T., Hoffmann, S., Sticht, H., Dau, H., Lingelbach, K., and Maier, U. G. (2000) Eukaryotically encoded and chloroplast-located rubredoxin is associated with photosystem II, *J Biol Chem* 275, 30058-30063.
 80. Gupta, N., Bonomi, F., Kurtz, D. M., Ravi, N., Wang, D. L., and Huynh, B. H. (1995) Recombinant *Desulfovibrio-Vulgaris* Rubrerythrin - Isolation and Characterization of the Diiron Domain, *Biochemistry-Us* 34, 3310-3318.
 81. Makris, T. M., Chakrabarti, M., Munck, E., and Lipscomb, J. D. (2010) A family of diiron monooxygenases catalyzing amino acid beta-hydroxylation in antibiotic biosynthesis, *P Natl Acad Sci USA* 107, 15391-15396.
 82. Coulter, E. D., Shenvi, N. V., Beharry, Z. M., Smith, J. J., Prickril, B. C., and Kurtz, D. M. (2000) Rubrerythrin-catalyzed substrate oxidation by dioxygen and hydrogen peroxide, *Inorg Chim Acta* 297, 231-241.
 83. Shimizu, F., Ogata, M., Yagi, T., Wakabayashi, S., and Matsubara, H. (1989) Amino-Acid-Sequence and Function of Rubredoxin from *Desulfovibrio-Vulgaris* Miyazaki, *Biochimie* 71, 1171-1177.
 84. Yoon, K. S., Hille, R., Hemann, C., and Tabita, F. R. (1999) Rubredoxin from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* functions as an electron acceptor for pyruvate ferredoxin oxidoreductase, *Journal of Biological Chemistry* 274, 29772-29778.
 85. Pierik, A. J., Wolbert, R. B., Portier, G. L., Verhagen, M. F., and Hagen, W. R. (1993) Nigerythrin and rubrerythrin from *Desulfovibrio vulgaris* each contain two mononuclear iron centers and two dinuclear iron clusters, *Eur J Biochem* 212, 237-245.
 86. Hatchikian, C. E., Jones, H. E., and Bruschi, M. (1979) Isolation and Characterization of a Rubredoxin and 2 Ferredoxins from *Desulfovibrio-Africanus*, *Biochim Biophys Acta* 548, 471-483.
 87. Riebe, O., Fischer, R. J., Wampler, D. A., Kurtz, D. M., and Bahl, H. (2009) Pathway for H₂O₂ and O₂ detoxification in *Clostridium acetobutylicum*, *Microbiol-Sgm* 155, 16-24.

88. Maralikova, B., Ali, V., Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T., van der Giezen, M., Henze, K., and Tovar, J. (2010) Bacterial-type oxygen detoxification and iron-sulfur cluster assembly in amoebal relict mitochondria, *Cell Microbiol* 12, 331-342.
89. Janoir, C., Deneve, C., Bouttier, S., Barbut, F., Hoys, S., Caleechum, L., Chapeton-Montes, D., Pereira, F. C., Henriques, A. O., Collignon, A., Monot, M., and Dupuy, B. (2013) Adaptive Strategies and Pathogenesis of *Clostridium difficile* from In Vivo Transcriptomics, *Infect Immun* 81, 3757-3769.

Parte VII

Anexos

7. Anexos

Tabela A 1. Preparação de meio LB e meio LA

Reagentes	Concentração (g/L)	
	LB	LA
Triptona	10	10
Extrato de levedura	5	5
NaCl	10	10
Agar	---	20

Tabela A 2. Preparação de tampão de lise

Solução	Concentração
Sucrose	0,2 mg/mL
Tris-HCl pH 8	50 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	1 mM
Lisozima	0,1 mg/mL
DNase I	20 µg/mL
PMSF	1 mM

Tabela A 3. Preparação de gel SDS 15%

Solução	Volume (mL)	
	Gel de resolução	Gel de concentração
Acrilamida 30%	10	1,7
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	5	-----
1 M Tris-HCl pH 6,8	-----	1,25
APS 10%	0,2	0,1
TEMED	0,008	0,010
SDS	0,2	0,1
H ₂ O	10	1,7

Tabela A 4. Composição do meio mínimo

Solução	Concentração final
M9 (5X)	1X
MgSO ₄	2 mM
CaCl ₂	0,1 mM
Glucose	20 mM
Kan	30 µg/ml
FeSO ₄	0,2 mM
H ₂ O	Até ao V _{final} de 1L
Inóculo	1%